

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



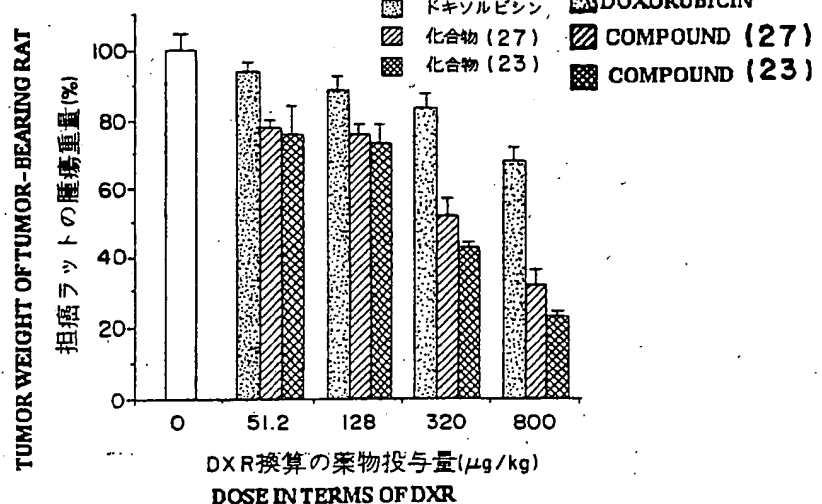
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|--|-----------------------------------|
| (51) 国際特許分類 C08B 37/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO 94/19376 |
| | | (43) 国際公開日 1994年9月1日(01.09.94) |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/J94/00322</p> <p>(22) 国際出願日 1994年2月28日(28. 02. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/38635 1993年2月26日(26. 02. 93) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディ・ディ・エス研究所 (DRUG DELIVERY SYSTEM INSTITUTE, LTD.)(JP/JP) 〒150 東京都渋谷区渋谷二丁目17番5号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者;および</p> <p>(75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 野草秀夫(NOGUSA, Hideo)(JP/JP) 〒277 千葉県柏市明原2-9-10 バイロットハウス柏103 Chiba, (JP) 浜名 洋(HAMANA, Hiroshi)(JP/JP) 〒278 千葉県野田市山崎2694 ビューバレー梅郷A-307号 Ohiba, (JP) 矢野敏明(YANO, Toshiro)(JP/JP) 〒277 千葉県柏市あけぼの3-1-8 セザール柏410 Chiba, (JP) 加治木正洋(KAJIKI, Masahiro)(JP/JP) 〒270-01 千葉県流山市西初石2-928-15 ジュネベレス初石301 Chiba, (JP)</p> | <p>山本敬司(YAMAMOTO, Keiji)(JP/JP) 〒270-01 千葉県流山市江戸川台西2-55 ハイック大下102号 Chiba, (JP) 奥野 哲(OKUNO, Satoshi)(JP/JP) 〒341 埼玉県三郷市早稲田8-5-18 Saitama, (JP) 菅原州一(SUGAWARA, Shuichi)(JP/JP) 〒277 千葉県柏市西柏台2-1-1 シティプラス柏1018 Chiba, (JP) 鹿島信一(KASHIMA, Nobukazu)(JP/JP) 〒270-01 千葉県流山市西初石4-474 パウハウス203号 Chiba, (JP) 井上和弘(INOUE, Kazuhiro)(JP/JP) 〒274 千葉県船橋市松ヶ丘5-6-6 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> | |

(54) Title: POLYSACCHARIDE DERIVATIVE AND DRUG CARRIER

(54) 発明の名称

多糖誘導体および薬物担体



(57) Abstract

A novel polysaccharide derivative, and a drug carrier and a drug composite both comprising said derivative. The derivative is a carboxylated polysaccharide wherein a peptide chain composed of one to eight same or different amino acids is introduced into part or all of the carboxyl groups of the polysaccharide and wherein part or all of those amino or carboxyl groups of the peptide chain which do not participate in the above linkage to the carboxyl groups of the polysaccharide may be bonded to the carboxyl, amino or hydroxyl groups of another compound (e.g. a drug) through amide or ester bonds. The derivative can migrate to the tumor-bearing region so readily that it can efficiently send drugs which are problematic in the side effects or have limited persistence of the drug activity in the tumor-bearing region.

(57) 要約

新規な多糖誘導体並びに新規な多糖誘導体からなる薬物担体および薬物複合体が開示されている。本発明による多糖誘導体は、カルボキシシル基を有する多糖の一部または全部のカルボキシシル基に、1-8個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖が導入されてなり、前記ペプチド鎖のカルボキシシル基との結合に関与していないアミノ基またはカルボキシシル基の一部または全部が、他の化合物（例えば薬物）の該カルボキシシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミド結合またはエステル結合していてもよいもの、である。

前記多糖誘導体は腫瘍への移行性が高い。従って、副作用または腫瘍における薬効の持続に限界のある薬剤を効率的に腫瘍に送達することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|----|---------|----|-------------|----|------------|
| AM | アルメニア | CZ | チェッコ共和国 | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NZ | ニュージーランド |
| AT | オーストリア | DE | ドイツ | KR | 大韓民国 | PL | ポーランド |
| AU | オーストラリア | DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | PT | ポルトガル |
| BB | バルバドス | EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | RO | ルーマニア |
| BE | ベルギー | ES | スペイン | LK | スリランカ | RU | ロシア連邦 |
| BF | ブルキナファソ | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SD | スーダン |
| BG | ブルガリア | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SE | スウェーデン |
| BJ | ベナン | GA | ガボン | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BR | ブラジル | GB | イギリス | MC | モナコ | SK | スロヴァキア共和国 |
| BY | ベラルーシ | GE | グルジア | MD | モルドバ | SN | セネガル |
| CA | カナダ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TD | チャド |
| CF | 中央アフリカ共和国 | GR | ギリシャ | ML | マリ | TG | トーゴ |
| CG | コンゴ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TJ | タジキスタン |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | TT | トリニダードトバゴ |
| CI | コートジボワール | IT | イタリア | MW | マラウイ | UA | ウクライナ |
| CM | カメルーン | JP | 日本 | NE | ニジェール | US | 米国 |
| CN | 中国 | KE | ケニア | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CS | チェコスロヴァキア | KG | キルギスタン | NO | ノルウェー | VN | ベトナム |

明 細 書

多糖誘導体および薬物担体

発明の背景産業上の利用分野

本発明は新規な多糖誘導体からなる薬物担体および薬物複合体に関し、更に詳しくは、多糖にペプチドが導入された薬物担体およびこれに更に薬物が導入された薬物複合体に関する。

従来技術

水溶性高分子を薬物担体として使用することは、従来からとりわけ製剤の分野において試みられ、関連する多数の技術が提供されてきた。多くの場合においてカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース誘導体が使用され、これらの物質自体の物理化学的性状を利用して薬物の分散化、徐放化等が意図されてきた。しかしこれらの例においては薬物は担体としてのセルロース誘導体と製剤的な混合によって一体化はしているものの、担体に化学結合しているものではない。

ところで、薬物を必要な組織に必要な時に必要な量だけ送達する、いわゆる薬物送達の技術において、水溶性高分子を薬物担体として利用する場合には、単なる混合

ではなく、薬物が担体に化学結合する必要がある。そのような試みとして多糖類について下記文献 1)、2)、3) があり、1) ではカルボキシル化デキストランにマイトマイシン C を結合する技術、2) ではマンナンにマイトマイシン C を結合する技術、3) では同じくマンナンにブレオマイシンを結合する技術がそれぞれ開示されている。

1) 瀬崎 仁：薬学雑誌、109, 611-621, (1989)

2) 第49回日本癌学会総会記事(1990)425頁、演題番号2155

3) 第49回日本癌学会総会記事(1990)425頁、演題番号2154

しかし、これら薬物を化学結合して薬物送達を行う技術については、その試みは未だ十分な展開がなされていないのが実状である。

発明の概要

本発明者らは今般、多糖について、その薬物担体としての利用の可能性を検討した。その結果、多糖にペプチド鎖を導入した多糖誘導体が、薬物担体として優れた性質を有することを見出した。

従って、本発明は、薬物が薬物担体に化学結合を介して保持され、薬物送達が可能で新規な薬物担体およびその薬物複合体を提供することを目的としている。

本発明によれば、カルボキシル基を有する多糖の一部または全部のカルボキシル基に、1～8個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖が導入されてなり、前記ペプチド鎖のカルボキシル基との結合に関与していないアミノ基またはカルボキシル基の一部または全部が、カルボキシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミド結合またはエステル結合していてもよい、多糖誘導体およびその塩が提供される。

本発明による多糖誘導体は腫瘍への移行性が高く、副作用のある薬物または腫瘍において薬効の持続に限界のある薬物を効率的に腫瘍に送達することができる。

また、本発明による多糖誘導体は体内において徐々に薬物を放出する性質を有することから、血中の薬物濃度を長時間にわたり維持することができる。

従って本発明によれば、多糖誘導体からなる薬物担体および薬物複合体が提供される。

本発明において「カルボキシル基を有する多糖」とは、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖（例えば、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなど）に加え、本来的にカルボキシル基を有さない多糖（例えば、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラビン、マンノグルカン、キトサンなど）であって、その

一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ
C₁₋₄アルキル基で置換されてなるものまたはその一
部もしくは全部の水酸基にエステル結合を介して多塩基
性酸が導入されてなるもの、をも意味するものとする。

また、本明細書において「多糖誘導体」という語は、
薬物担体である場合と薬物と結合した薬物複合体である
場合の両方を含むものとする。また、本明細書において
「酸アミド結合」とは、ウレタン結合およびウレア結合
をも含む意味に用いることとする。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1で得られたカルボキシメチルプル
ランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(23)の紫外・可視部吸収スペ
クトル(濃度: 300 μg/ml、溶媒: 水)を示した図
である。

第2図は、実施例1で得られたカルボキシメチルプル
ランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(23)のゲルろ過溶出パターン
(検出: 478 nmにおける可視吸光度)を示した図で
ある。

第3図は、実施例2で得られたカルボキシメチルプル
ランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(24)の紫外・可視部吸収スペ
クトル(濃度: 300 μg/ml、溶媒: 水)を示した図

である。

第4図は、実施例2で得られたカルボキシメチルプルランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(24)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478 nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第5図は、実施例7で得られたカルボキシメチルプルランナトリウム塩-3'-N-Gly-DXR(29)の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 200 μ g/ml、溶媒: 水)を示した図である。

第6図は、実施例7で得られたカルボキシメチルプルランナトリウム塩-3'-N-Gly-DXR(29)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478 nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第7図は、実施例15で得られたスクシニルプルランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(42)の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 300 μ g/ml、溶媒: 水)を示した図である。

第8図は、実施例15で得られたスクシニルプルランナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(42)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478 nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第9図は、実施例16で得られたカルボキシメチルキ

チシナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (44) の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度 : 1.1 m g / m l、溶媒 : 水) を示した図である。

第10図は、実施例16で得られたカルボキシメチルキチナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (44) のゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 n m における可視吸光度) を示した図である。

第11図は、実施例17で得られたカルボキシメチルデキストランナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (46) の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度 : 400 μ g / m l、溶媒 : 水) を示した図である。

第12図は、実施例17で得られたカルボキシメチルデキストランナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R の (46) ゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 n m における可視吸光度) を示した図である。

第13図は、実施例18で得られたカルボキシメチルマンノグルカンナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (48) の紫外・可視部吸収スペクトル (濃度 : 1.12 m g / m l、溶媒 : 水) を示した図である。

第14図は、実施例18で得られたカルボキシメチルマンノグルカンナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(48)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第15図は、実施例19で得られたN-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリンナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(50)の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 257 μ g/ml、溶媒: 水)を示した図である。

第16図は、実施例19で得られたN-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリンナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(50)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第17図は、実施例20で得られたヒアルロン酸ナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(53)の紫外・可視部吸収スペクトル(濃度: 181 μ g/ml、溶媒: 水)を示した図である。

第18図は、実施例20で得られたヒアルロン酸ナトリウム塩-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR(53)のゲルろ過溶出パターン(検出: 478nmにおける可視吸光度)を示した図である。

第 19 図は、本発明による薬物複合体またはドキソルビシンの投与量と腫瘍重量との関係を表わしたグラフである。

第 20 図は、本発明による薬物複合体またはドキソルビシンが投与された正常ラットの体重変化を表わしたグラフである。

発明の具体的説明

多糖誘導体

本発明による多糖誘導体には、まず本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖を基本骨格として有するものが含まれる。

さらに本発明による多糖誘導体には、本来的にその構造中にカルボキシル基を有さない多糖を基本骨格として有するものも含まれる。この本来的にその構造中にカルボキシル基を有さない多糖を基本骨格として有する多糖誘導体は、その一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ C₁ - 4 アルキル基で置換された構造、または、その一部もしくは全部の水酸基にエステル結合を介して多塩基性酸が導入された構造を有することで、カルボキシル基を有していなければならない。

本発明による多糖誘導体は、上記多糖が有するカルボキシル基にペプチド鎖が導入されてなる構造を有する。

多糖の水酸基の水素原子と置換されるカルボキシ C₁ - 4 アルキル基のアルキル部分は直鎖または分岐鎖

のいずれをも含むものとする。カルボキシ C₁ - 4 アルキル基の好ましい例としては、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、カルボキシプロピル基、カルボキシイソプロピル基、カルボキシブチル基などが挙げられる。

多糖の水酸基にエステル結合を介して導入される多塩基性酸とは、酸 1 分子中に供与し得るプロトンを 2 以上有する酸、すなわち塩基度 2 以上の酸、をいう。多塩基性酸の好ましい例としては、マロン酸、コハク酸、グルタール酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、シトラコン酸、シスアコニット酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、ジグリコール酸などが挙げられる。

上記において、カルボキシアルキル基または多塩基性酸の導入の程度は、糖残基一つあたりのカルボキシアルキル基または多塩基性酸の数（ペプチド鎖が更にこれらに導入された基も含む）として定義される「置換度」によって表すことができる。すなわち、

$$\text{置換度} = \frac{\text{分子中のカルボキシアルキル基および多塩基性酸の総数}}{\text{分子中の糖残基の総数}}$$

と表すことができる。なお、以下この置換度を、カルボキシアルキル基がカルボキシメチル基である場合には「カルボキシメチル化度」と、多塩基性酸がコハク酸で

ある場合には「スクシニル化度」と、いうことがある。

多糖がプルランの場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は3であり、0.1以上が好ましい。

多糖がキチンである場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は2であり、0.1以上が好ましい。

多糖がデキストランである場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は3であり、0.1以上が好ましい。

多糖がマンノグルカンである場合、全ての水酸基が置換された場合には置換度は3であり、0.1以上が好ましい。

なお、多糖が元来カルボキシル基を有するものである場合を除き、多糖誘導体分子中に少なくとも1つのカルボキシアルキル基または多塩基性酸が存在していることが必要である。従って、この意味で置換度が0である化合物は多糖誘導体から除かれる。

本発明において多糖に導入されるペプチド鎖は、1～8個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるものである。このアミノ酸の数は薬物放出特性を考慮すると2以上であるのがより好ましく、またその合成工程の煩雑さを考慮すると6以下であるのがより好ましく、更に好ましくは4以下である。

アミノ酸の種類については特に限定されないが、本発明の好ましい態様によれば、アミノ酸が中性アミノ酸で

かつ 2 以上の場合であって、アミノ酸が異種の組み合わせであるのが好ましい。このようなペプチド鎖の例としては、 $-P h e - G l y -$ および鎖中にこの配列を含むペプチド鎖が挙げられる（ここで、この $-P h e - G l y -$ および鎖中にこの配列を含むペプチド鎖の N 末端側が多糖のカルボキシル基に導入されてなる）。

また、「アミノ酸を含んでなるペプチド鎖」とは、このペプチド鎖がアミノ酸のみからなる場合に加えて、鎖中の一部にアミノ酸以外の化合物を含む場合も包含する意味に用いることとする。例えば、コハク酸のような二塩基性カルボン酸がペプチド鎖の中にまたは末端に存在していてもよい。また、このペプチド鎖を構成するアミノ酸は、 α -アミノ酸のほかに、 ϵ -アミノカブロン酸、 γ -アミノ酪酸などのアミノ酸類似の化合物であってもよい。また、ペプチド鎖の結合方向は、多糖のカルボキシル基に N 末端から酸アミド結合によって結合しているのが通常であるが、 α -アミノ酸以外のアミノ酸（例えば、ペプチド鎖中にリジンが存在する場合にはその ϵ -アミノ基）を多糖のカルボキシル基と結合させることによってペプチド鎖の結合方向を逆転させてもよい。

多糖のカルボキシル基へのペプチド鎖の導入は全てのそのカルボキシル基にされていてもよいが、そのペプチド鎖に導入される薬物の物理化学的性質および薬理的性質に応じてその導入の程度を適宜決定するのが好まし

い。

このペプチド鎖のアミノ酸配列は、臓器内での酵素（例えばプロテアーゼ、ペプチダーゼ）による作用で、薬物またはその活性分子種が速やかに、場合によって徐々に生成されるものでなければならない。アミノ酸は、中性アミノ酸、塩基性アミノ酸および酸性アミノ酸のいずれであってもよい。

多糖のカルボキシル基との結合に関与していないペプチドのアミノ基またはカルボキシル基は、他の化合物のカルボキシル基、アミノ基または水酸基と酸アミド結合またはエステル結合していてもよい。

他の化合物としては、ペプチド末端のアミノ基またはカルボキシル基と結合してペプチドを保護する化合物が挙げられる。この化合物のうち官能基を保護する部分、いわゆる保護基は一般にアミノ酸の保護に用いられているものであれば制限されないが、例えばアミノ基の保護基としては t -ブトキシカルボニル基、 p -メトキシベンジルオキシカルボニル基などが、またカルボキシル基の保護基としては低級アルコキシ基（例えば t -ブチルオキシ基）、低級アルキルイミノ基（例えばメチルイミノ基）、ベンジルオキシ基などを挙げることができる。

他の化合物がアミノ基、カルボキシル基または水酸基を有する薬物である場合、薬物が酸アミド結合またはエステル結合により導入されていて、薬物複合体を形成し

ている場合も、本発明による多糖誘導体に包含される。

本発明による多糖誘導体はその塩として存在することができるが、その用途を考慮すれば薬学上許容可能な塩であることが好ましい。そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩などが挙げられる。

本発明による多糖誘導体は、それに薬物を担持させて腫瘍組織等にその薬物を送達する、薬物担体として利用することができる。また、本発明による多糖誘導体は、生体内で薬物を放出するとともに、長時間の体内残留が起こらないことが期待される。

本発明による多糖誘導体のペプチド鎖への抗腫瘍剤その他の薬物の導入は、薬物を、ペプチド鎖の末端アミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基を利用して行うことができる。

例えば、アミノ基を有する薬物は、末端アミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合することが可能である。またアルコール性水酸基を有する薬物は、末端アミノ酸のカルボキシル基とエステル結合することが可能である。さらにカルボキシル基を有する薬物は、末端アミノ酸のアミノ基と結合することが可能である。

このような薬物の具体例として、アミノ基を有する薬物としては、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイト

マイシン C、プレオマイシンなどが挙げられ、アルコール性水酸基を有する薬物としては、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、アドレナリンなどが挙げられる。またカルボキシル基を有する薬物としては、メトトレキサート、ブメタニド、フロセミド、ジノプロストなどが挙げられる。

これら以外にも、ペプチド鎖と酸アミド結合またはエステル結合し得るような誘導体に変換された薬物を用いることも可能である。

多糖誘導体への薬物の導入率は、薬物および多糖の種類によって適宜選択されるが、一般的には以下のとおりである。

多糖がプルランの場合には 0.1 ~ 30 重量% が好ましく、1 ~ 10 重量% が特に好ましい。

多糖がキチンの場合には 0.1 ~ 30 重量% が好ましく、1 ~ 10 重量% が特に好ましい。

多糖がデキストランの場合には 0.1 ~ 30 重量% が好ましく、1 ~ 10 重量% が特に好ましい。

多糖がマンノグルカンの場合には 0.1 ~ 30 重量% が好ましく、1 ~ 10 重量% が特に好ましい。

多糖が N-アセチル-脱 N-硫酸化ヘパリンの場合には 0.1 ~ 30 重量% が好ましく、1 ~ 10 重量% が特に好ましい。

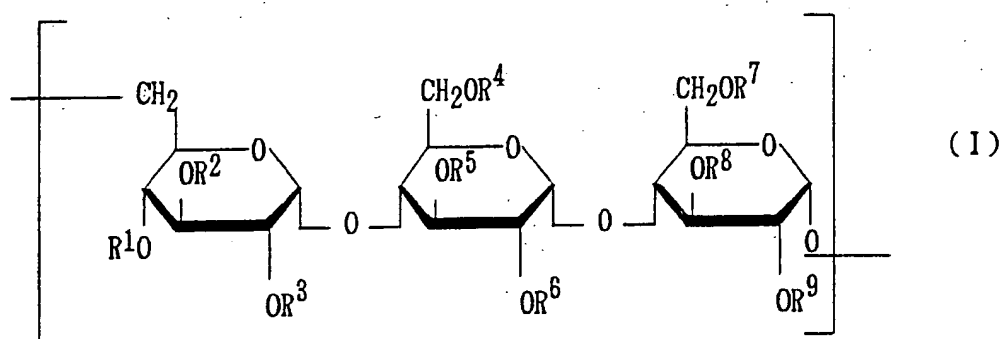
多糖がヒアルロン酸の場合には 0.1 ~ 30 重量% が

好ましく、1～10重量％が特に好ましい。

本発明による多糖誘導体のうち薬物を導入した薬物複合体も、その塩として存在することができる。好適な塩の例としてはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、アルギニン塩、リジン塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

多糖がプルラン、キチン、デキストラン、マンノグルカン、N-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリン、ヒアルロン酸である多糖誘導体について説明すると以下のとおりである。

多糖がプルランである多糖誘導体（以下「プルラン誘導体」ということがある）は、下記式（I）で表される繰返し単位を含んでなるもの、である。



(上記式中、 R^{1-9} は、同一または異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子、基 $-(CH_2)_m-CO-X$ 、基 $-CO-(CH_2)_n-CO-X$ または基 $-CO-A-CO-X$ (ここで、 $-CO-A-CO-$ は多塩基性酸の二個のカルボキシル基の水酸基が除かれた多塩基性酸残基を表す) を表し、

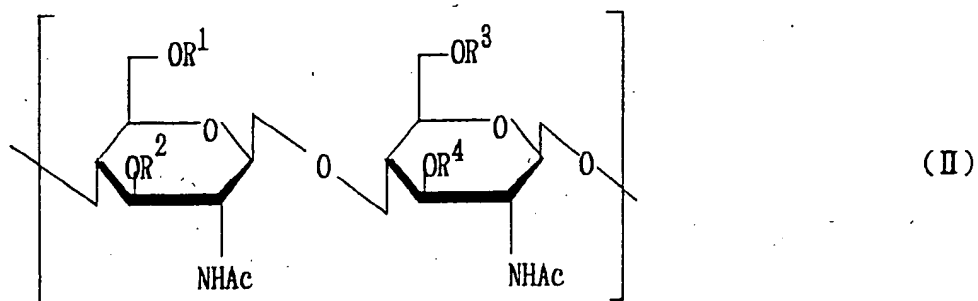
ここで、 X は、水素原子または 1 ~ 8 個の同一もしくは異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表し、該ペプチド鎖のカルボキシル基との結合に関与していないアミノ基またはカルボキシル基の一部または全部は、カルボキシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミド結合またはエステル結合していてもよく、

m は 1 ~ 4 の整数を表し、 n は 1 ~ 4 の整数を表す)

上記プルラン誘導体の分子量は、そのプルラン部分において $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のものがより好ましい。

プルラン誘導体においては、糖残基 1 つあたり 0.001 ~ 3.0 のペプチド鎖が導入されているのが好ましく、より好ましくは 0.01 ~ 0.1 である。

多糖がキチンである多糖誘導体 (以下「キチン誘導体」ということがある) は、下記式 (II) で表される繰り返し単位を含んでなるもの、である。

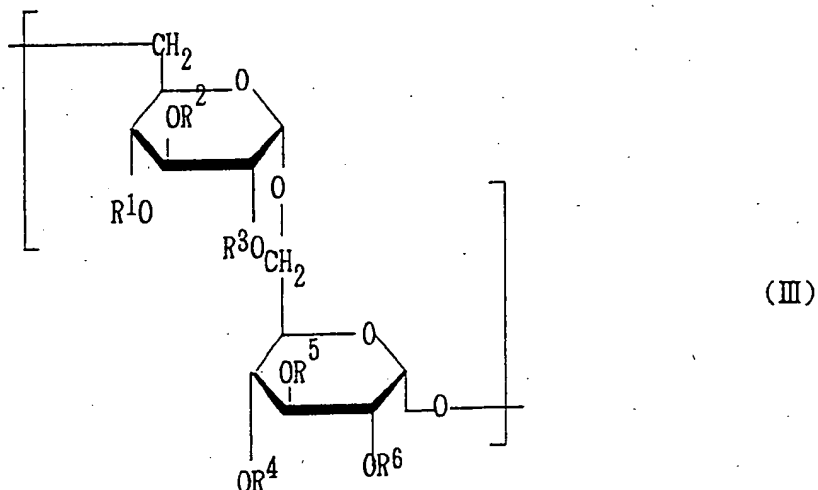


(上記式中、 $R^1 - 4$ は、同一または異なっているにもかかわらず、それぞれ式 (I) で定義されたものと同一内容の基を表す)

上記キチン誘導体の分子量は、そのキチン部分において $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のものがより好ましい。

キチン誘導体においては糖残基 1 つあたり 0.001 ~ 2.0 のペプチド鎖が導入されているのが好ましく、より好ましくは 0.01 ~ 0.1 である。

多糖がデキストランである多糖誘導体（以下「デキストラン誘導体」ということがある）は、下記式（III）で表される繰り返し単位を含んでなるもの、である。

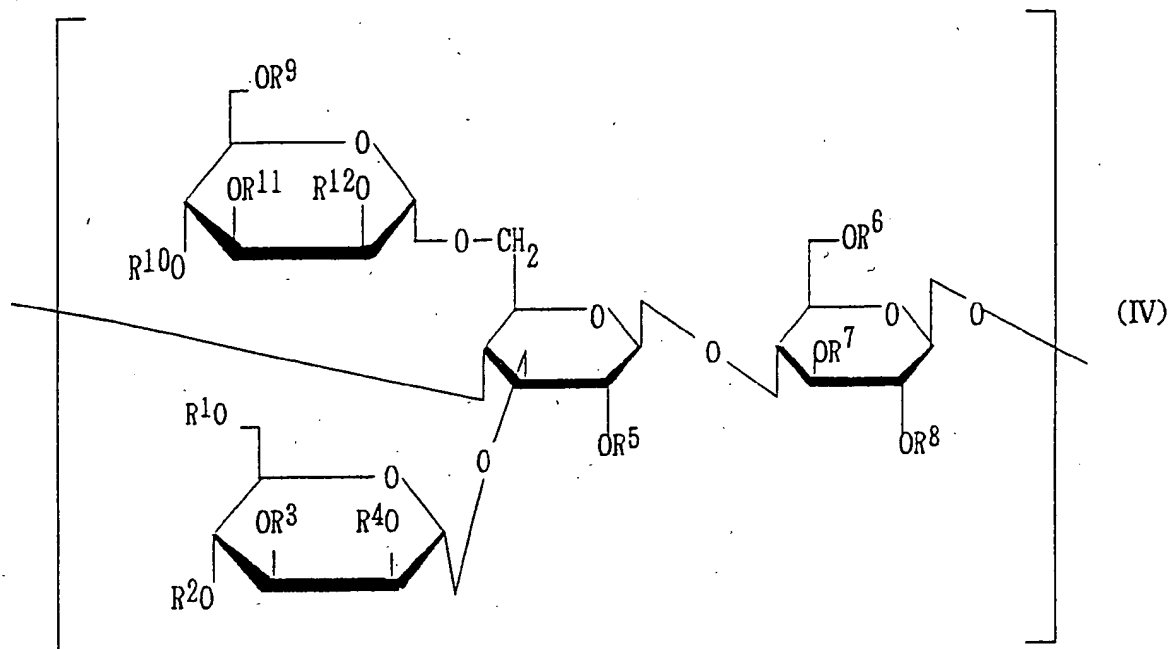


（上記式中、 $R^1 - 6$ は、同一または異なっているけれどもよく、それぞれ式（I）で定義されたものと同一内容の基を表す）

上記デキストラン誘導体の分子量は、そのデキストラン部分において $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のものがより好ましい。

デキストラン誘導体においては糖残基 1 つあたり 0.001 ~ 3.0 のペプチド鎖が導入されているのが好ましく、より好ましくは 0.01 ~ 0.1 である。

多糖がマンノグルカンである多糖誘導体（以下「マンノグルカン誘導体」ということがある）は、下記式（IV）で表される繰返し単位を含んでなるもの、である。



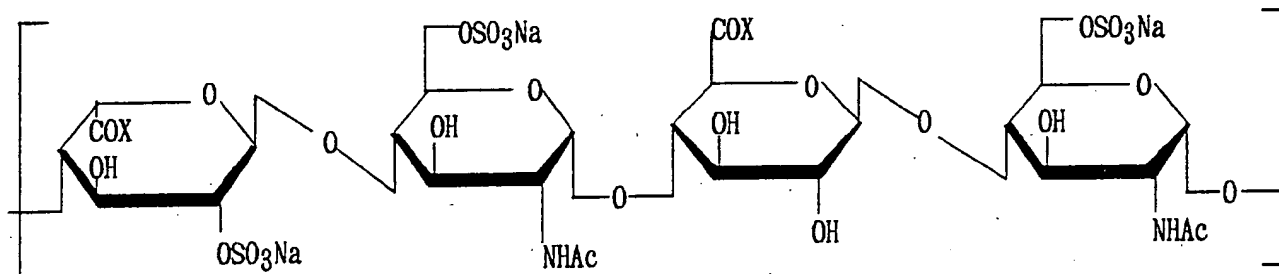
（上記式中、 $R^1 - 9$ は、同一または異なっているとしてもよく、それぞれ式（I）で定義されたものと同一内容の基を表し、 $R^{10} - 12$ は同一または異なっているとしてもよく、それぞれ $R^1 - 9$ と同一内容の基を表す）

上記マンノグルカン誘導体の分子量は、そのマンノグルカン部分において $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のものがより好ましい。

マンノグルカン誘導体においては繰返し単位あたり 0.004 ~ 12.0 のペプチド鎖が導入されているのが好ましく、より好ましくは 0.04 ~ 0.4 である。

本発明による多糖誘導体においては、各糖単位の構造が前記一般式 (I) ~ (IV) のいずれかの範囲内にあれば、隣り合う糖単位においてそのカルボキシアルキル基または多塩基性酸の導入位置は、同一でも異なっているもよい。

多糖が N-アセチル-脱 N-硫酸化ヘパリンである多糖誘導体 (以下「ヘパリン誘導体」ということがある) は、下記式 (V) で表される繰り返し単位を含んでなるもの、である。



(V)

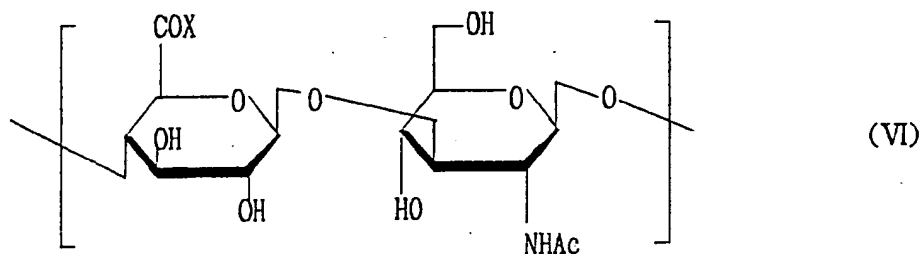
(上記式中、X は 1 ~ 8 個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表し、該ペプチド鎖の、N-アセチル-脱 N-硫酸化ヘパリンとの結合に関与していないアミノ基またはカルボキシル基の一部または全部は、カルボキシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミ

ド結合またはエステル結合していてもよい)

上記ヘパリン誘導体の分子量は、そのNアセチル-脱N硫酸化ヘパリン部分において $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ のものがより好ましい。

ヘパリン誘導体においては繰り返し単位あたり0.001～2.0のペプチド鎖が導入されているのが好ましく、より好ましくは0.01～0.1である。

多糖がヒアルロン酸である多糖誘導体（以下「ヒアルロン酸誘導体」ということがある）は、下記式（VI）で表される繰り返し単位を含んでなるもの、である。



（上記式中、Xは式（V）と同一内容のペプチド鎖を表す）

上記ヒアルロン酸誘導体の分子量は、そのヒアルロン酸部分において $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^6$ のものが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のものがより好ましい。

ヒアルロン酸誘導体においては繰り返し単位あたり0.001～0.1のペプチド鎖が導入されているのが好ま

しく、より好ましくは0.01～0.1である。

多糖誘導体の製造

カルボキシアルキル基で修飾される多糖は、多糖の水酸基の水素原子をカルボキシアルキル基で置換することによって得ることができる。具体的には、例えば多糖をカルボキシアルキル化反応に関与しない溶媒（例えば、 H_2O 、 N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなど）にアルカリ（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなど）存在下で溶解し、次いでハロゲン化酢酸またはその塩（例えば、クロロ酢酸）を加え、4～100℃の温度下で数分～数日間かけて反応させることによって得ることができる。この場合、温度並びにクロロ酢酸およびアルカリの添加量を変化させることにより「置換度」を調節することができる。

また、多塩基性酸で修飾される多糖は、多糖の水酸基に多塩基性酸を導入することによって得ることができる。具体的には、例えば多糖を反応に関与しない溶媒（例えば、 H_2O 、 N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなど）中で、アルカリ（例えば溶媒として水を用いる場合には重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム、アンモニア水等、溶媒として N,N -ジメチルホルムアミドまたはジメチルスルホキシド等を用いる場合にはピリジン、トリエチルアミンまたは酢酸アミン等）の存在下で、氷冷下～80℃の温度下で、

数分～数日間かけて反応させることによって得ることができる。この場合、温度およびアルカリの添加量を変化させることにより「置換度」を調節することができる。

本発明による多糖誘導体は、多糖のカルボキシル基に、ペプチドを導入することによって得ることができる。具体的には、例えば多糖のカルボキシル基とペプチド鎖のN末端とを酸アミド結合によって結合させる場合、多糖と、C末端を保護したペプチド鎖とを、反応に関与しない溶媒の存在下で、 $-20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で数時間～数日間反応させることによって得ることができる。この場合、反応溶液中に適当な縮合剤、例えば、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-エトキシカルボニル-2-エトキシー-1, 2-ジヒドロキノリン等を加えることが好ましい。また場合によっては、多糖のカルボキシル基をN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルのような活性エステルにして反応を行っても良い。

多糖へのペプチド鎖の導入の程度は、添加するペプチドの量によって調整することができる。従って、すべてのカルボキシル基にペプチド鎖を導入したい場合には、過剰量のペプチドを反応させるのが好ましい。

薬物複合体は、上記のようにして得た多糖誘導体のペプチドに薬物を、ペプチドおよび薬物のそれぞれが有す

る官能基の結合を介して導入することによって得ることができる。

また、あらかじめ薬物を結合させたペプチド鎖を多糖に導入することによっても得ることができる。

ここで、ペプチド鎖への薬物の導入は、ペプチド鎖のカルボキシル基またはアミノ基と、薬物の官能基または活性化された置換基とを反応させることによって行うことができる。例えば、ペプチドのC末端に導入する場合、このC末端にアミノ基を有する薬物を酸アミド結合によって導入する。この反応は、場合によってN-ヒドロキシコハク酸イミドエステル等のような活性エステルとされたペプチドと、薬物とを酸アミド結合形成条件下で反応させることによって実施することができる。また、C末端への導入は、このC末端にアルコール性水酸基を有する薬物をエステル結合を介して行うことができる。さらに、ペプチドのN末端に導入する場合、このN末端にカルボキシル基を有する薬物を酸アミド結合を介して導入することもできる。

さらに、本発明による多糖誘導体は、ペプチド鎖を導入した薬物を先に得て、それを多糖に導入する順序で得てもよい。ペプチド鎖への薬物の導入は、上記した多糖誘導体への薬物の導入と同様に、その利用しようとする官能基の性質に従って適宜実施することができる。なお、薬物とペプチド鎖とを反応させる場合、ペプチド鎖の反

応に関与しない N 末端または C 末端を保護基で保護しておくのが好ましい。

本発明においては、一部の水酸基がポリエチレングリコールなどでエーテル化された多糖を使用することも可能である。また、多糖を酵素によって任意の分子量のものに分解して使用することも可能である。

実施例

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

また、実施例中の化合物番号は後記する合成過程を示すスキーム中に示された番号である。

さらに以下の実施例において、多糖誘導体のカルボキシメチル化度またはスクシニル化度は、アルカリ滴定によって求めた。また、薬物の導入量（重量％）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（478nm 付近）から求めた。さらにゲルろ過法は間の条件によって行った（カラム：TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液：0.1 M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40℃、試料注入量：約 50 μg）。

以下の参考例および実施例では次の略号を使用する。
DXR：ドキシソルピシン、DNR：ダウノルピシン、Trt：トリフェニルメチル基（トリチル基）。

参考例 1カルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2)

プルラン (1) (10 g、重量平均分子量：約 15 万、株式会社林原生物化学研究所製) を 6 N 水酸化ナトリウム溶液 (140 ml) に溶解した。次にクロロ酢酸 (30 g) を加えて、70℃で 2 時間攪拌した。反応後、メタノール (1000 ml) を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を精製水 (100 ml) に溶解し、透析膜 (分子量カットオフ 12,000 ~ 14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として 4℃で 2 日間透析した。透析内液を取りだし、凍結乾燥して標記化合物 (2) (8.7 g) を得た。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度は、0.6 であった。

参考例 2カルボキシメチルプルランナトリウム塩 (3)

プルラン (1) (5 g、重量平均分子量：約 15 万、株式会社林原生物化学研究所製) を 1 N 水酸化ナトリウム溶液 (250 ml) に溶解した。次にクロロ酢酸 (7.5 g) を加えて、70℃で 2 時間攪拌した。反応後、メタノール (1000 ml) を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を精製水 (100 ml) に溶解し、透析膜 (分子量カットオフ 12,000 ~ 14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として 4℃で 2 日間透析した。透析内液を取りだし、凍結乾燥して標記

化合物 (3) (2.9 g) を得た。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度は、0.2 であった。

参考例 3

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 (4)

プルラン (1) (10 g、Mw = 重量平均分子量：約 15 万、株式会社林原生物化学研究所製) を 6 N 水酸化ナトリウム溶液 (140 ml) に溶解した。次にクロロ酢酸 (30 g) を加えて、70℃ で 2 時間攪拌した。反応後、メタノール (1000 ml) を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を減圧下で乾燥した。同様の操作をさらに 2 回繰り返した後、水 (100 ml) に溶解し、透析膜 (分子量カットオフ 12,000 ~ 14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として 4℃ で 2 日間透析した。透析内液を取りだし、凍結乾燥して標記化合物 (4) (4.9 g) を得た。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度は、1.2 であった。

参考例 4

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 (6)

プルラン (5) (0.5 g、重量平均分子量：約 40 万、株式会社林原生物化学研究所製) を 1 N 水酸化ナトリウム溶液 (25 ml) に溶解した。次にクロロ酢酸 (0.75 g) を加えて、70℃ で 2 時間攪拌した。反応後、メタノール (100 ml) を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を精製水 (10 ml) に溶解し、透析膜 (分

分子量カットオフ 12,000 ~ 14,000、スペクトラム社製)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液を取りだし、凍結乾燥して標記化合物(6)(0.45g)を得た。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度は、0.2であった。

参考例 5

カルボキシメチルプルランナトリウム塩(8)

プルラン(7)(0.5g、重量平均分子量：約2万3千)(株式会社林原生物化学研究所製)を6N水酸化ナトリウム溶液(7ml)に溶解した。次にクロロ酢酸(1.5g)を加えて、70℃で2時間攪拌した。反応後、メタノール(100ml)を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を減圧下で乾燥した。同様の操作をさらに1回繰り返した後、精製水(10ml)に溶解し、透析膜(分子量カットオフ1,000、スペクトラム社製)を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液を取りだし、凍結乾燥して標記化合物(8)(0.4g)を得た。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度は、1.0であった。

参考例 6

3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-D XR·HCl(10)

N^α-Trt-Gly-Gly-Phe-Gly(9)
(475mg、0.82mmol)およびN-ヒドロキシコハ

ク酸イミド (115 mg、1.0 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (4 ml) に溶解して 4℃ に冷却した。次に N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (206 mg、1.0 mmol) を添加して 4℃ で 2 時間攪拌した。この溶液に DXR (446 mg、0.82 mmol) を溶解した N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて、4℃ で 10 時間攪拌した。反応液に水 (30 ml) を加えて、クロロホルム (100 ml × 3 回) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、留去して、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー (2.5 cm × 40 cm、クロロホルム : メタノール = 20 : 1) で精製して 3'-N-(N^α-Trt-Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR (766 mg) を得た。この化合物 (750 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。反応液に水 (50 ml) を加えて、析出物をろ過した後、水層を凍結乾燥した。精製水 (10 ml) に溶解後、陰イオン交換樹脂 (AG1-X8 (Cl⁻ 型)、BIO-RAD) 5 ml のカラムに通した。クロロホルムで抽出した後、水層を凍結乾燥して標記化合物 (10) (462 mg) を得た。¹H-n.m.r. (CD₃OD) : δ 7.91 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H-1) 7.80 (t, 1H, H-2) 7.54 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H-3) 7.16 ~ 7.26 (m, 5H, Phe-aromatic) 5.43 (d, 1H, J = 3.9 Hz,

H - 1') 5. 13 (b s , 1 H , H - 7) 4. 73
 (s , 2 H , H - 14) 4. 43 (d d , 1 H , J = 8.
 4 , 6. 6 H z , P h e - α - C H) 4. 30 (q , 1
 H , J = 6. 6 H z , H - 5') 4. 16 (d d d , 1
 H , H - 3') 4. 03 (d , 1 H , J = 17. 0 H z ,
 1 H , G l y - α - C H a) 4. 02 (s , 3 H , 4 -
 O C H ₃) 3. 86 (d , 1 H , J = 16. 9 H z , G
 l y - α - C H a) 3. 83 (d , 1 H , J = 17. 0
 H z , G l y - α - C H b) 3. 77 (d , 1 H , J =
 15. 9 H z , G l y - α - C H a) 3. 73 (d , 1
 H , J = 15. 9 H z , G l y - α - C H b) 3. 62
 (d , 1 H , J = 1. 5 H z , H - 4') 3. 59 (d ,
 1 H , J = 16. 9 H z , G l y - α - C H b) 3. 1
 3 (d d , 1 H , J = 13. 9 , 6. 6 H z , P h e -
 β - C H a) 3. 10 (d , 1 H , J = 18. 6 H z ,
 H - 10 a) 3. 00 (d , 1 H , J = 18. 6 H z ,
 H - 10 b) 2. 94 (d d , 1 H , J = 13. 9 , 8.
 4 H z , P h e - β - C H b) 2. 38 (d , 1 H , J
 = 14. 7 H z , H - 8 a) 2. 19 (d d , 1 H , J
 = 14. 7 , 5. 1 H z , H - 8 b) 1. 98 (d d d ,
 1 H , J = 12. 7 , 12. 7 , 3. 9 H z , H - 2'
 a) 1. 71 (d d , 1 H , J = 12. 7 , 4. 6 H z ,
 H - 2' b) 1. 28 (d , 3 H , J = 6. 6 H z , H
 - 6') .

参考例 7

3' - N - (G l y - P h e - G l y - G l y) - D
X R · H C l (1 2)

参考例 6 と同様の方法により N^α - T r t - G l y - P h e - G l y - G l y (1 1) (5 7 9 mg、1. 0 mmol) と N - ヒドロキシコハク酸イミド (1 2 7 mg、1. 1 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液に N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (2 2 6 mg、1. 1 mmol) を添加し、次いで D X R (5 4 4 mg、1. 0 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3' - N - (N^α - T r t - G l y - P h e - G l y - G l y) - D X R (6 7 0 mg) を得た。次にこの化合物 (5 9 5 mg) を 7 5 % 酢酸 (3 ml) で処理して脱 N - トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物 (1 2) (3 1 6 mg) を得た。

¹ H - n . m . r . (C D ₃ O D) : δ 7 . 9 7 (d , 1 H , J = 7 . 3 H z , H - 1) 7 . 8 4 (t , 1 H , H - 2) 7 . 5 7 (d , 1 H , J = 8 . 3 H z , H - 3) 7 . 1 8 ~ 7 . 2 8 (m , 5 H , P h e - a r o m a t i c) 5 . 4 4 (d , 1 H , J = 3 . 4 H z , H - 1 ') 5 . 1 7 (b s , 1 H , H - 7) 4 . 7 5 (d , 1 H , J = 2 0 . 8 H z , H - 1 4 a) 4 . 7 0 (d , 1 H , J = 2 0 . 8 H z , H - 1 4 b) 4 . 5 9 (d d , 1 H , J = 8 . 4 , 6 . 0 H z , P h e - α - C H) 4 . 2 8

(q, 1 H, J = 6.6 Hz, H-5') 4.14 (d
 dd, 1 H, H-3') 4.03 (s, 3 H, 4-OC
 H₃) 3.85 (d, 1 H, J = 16.6 Hz, 1 H,
 Gly- α -CHa) 3.84 (d, 1 H, J = 16.
 1 Hz, Gly- α -CHa) 3.79 (d, 1 H, J
 = 16.6 Hz, Gly- α -CHb) 3.69 (d,
 1 H, J = 16.1 Hz, Gly- α -CHb) 3.6
 8 (d, 1 H, J = 16.1 Hz, Gly- α -CHa)
 3.62 (d, 1 H, J = 1.5 Hz, H-4') 3.
 56 (d, 1 H, J = 16.1 Hz, Gly- α -CH
 b) 3.12 (dd, 1 H, J = 14.0, 6.0 Hz,
 Phe- β -CHa) 3.12 (d, 1 H, J = 18.
 5 Hz, H-10a) 3.04 (d, 1 H, J = 18.
 5 Hz, H-10b) 2.94 (dd, 1 H, J = 14.
 0, 8.4 Hz, Phe- β -CHb) 2.38 (d,
 1 H, J = 14.7 Hz, H-8a) 2.19 (dd,
 1 H, J = 14.7, 5.1 Hz, H-8b) 2.05
 (ddd, 1 H, J = 12.7, 12.7, 3.4 Hz,
 H-2' a) 1.71 (dd, 1 H, J = 12.7, 4.
 6 Hz, H-2' b) 1.28 (d, 3 H, J = 6.6
 Hz, H-6')。

参考例 83' - N - (Ala - Leu - Ala - Leu) - D
XR · HCl (14)

参考例 6 と同様の方法により N^{α} - Trt - Ala - Leu - Ala - Leu (13) (314 mg、0.50 mmol) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (71 mg、0.62 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (127 mg、0.62 mmol) を添加し、次いで DXR (272 mg、0.50 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3' - N - (N^{α} - Trt - Gly - Phe - Gly - Gly) - DXR (324 mg) を得た。次にこの化合物 (310 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) で処理して脱 N-トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物 (14) (217 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 7.95 (d, 1H, $J = 7.3\text{ Hz}$, H-1) 7.83 (t, 1H, H-2) 7.57 (d, 1H, $J = 8.3\text{ Hz}$, H-3) 5.40 (d, 1H, $J = 3.2\text{ Hz}$, H-1') 5.13 (bs, 1H, H-7) 4.75 (d, 1H, $J = 20.8\text{ Hz}$, H-14a) 4.70 (d, 1H, $J = 20.8\text{ Hz}$, H-14b) 4.37 (t, 1H, $J = 7.4\text{ Hz}$, Leu- α -CH) 4.34 (t, 1H, $J = 7.3\text{ Hz}$, Leu- α -CH) 4.28 (q, 1

H, J = 6.6 Hz, H-5') 4.26 (q, 1H, J = 7.2 Hz, Ala- α -CH) 4.14 (ddd, 1H, H-3') 4.03 (s, 3H, 4-OCH₃) 3.75 (q, 1H, J = 7.1 Hz, Ala- α -CH) 3.57 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H-4') 3.07 (d, 1H, J = 18.0 Hz, H-10a) 2.93 (d, 1H, J = 18.0 Hz, H-10b) 2.38 (d, 1H, J = 14.7 Hz, H-8a) 2.19 (dd, 1H, J = 14.7, 5.1 Hz, H-8b) 2.05 (ddd, 1H, J = 12.7, 12.7, 3.2 Hz, H-2' a) 1.71 (dd, 1H, J = 12.7, 4.6 Hz, H-2' b) 1.54 ~ 1.68 (m, 6H, Leu- β -CH₂ X 2, Leu- γ -CH X 2) 1.40 (d, 3H, J = 7.1 Hz, Ala- β -CH₃) 1.28 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H-6') 1.26 (d, 3H, J = 7.2 Hz, Ala- β -CH₃) 0.87 ~ 0.93 (m, 12H, Leu- δ -CH₃ X 4)。

参考例 9

3' - N - G l y - D X R · H C l (16)

参考例 6 と同様の方法により N ^{α} - T r t - G l y (15) (127 mg、0.40 mmol) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (51 mg、0.44 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液に N, N'-ジシクロ

ヘキシルカルボジイミド (91 mg、0.44 mmol) を添加し、次いで DXR (220 mg、0.40 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3'-N-(N^α-Trt-Gly)-DXR (233 mg) を得た。次にこの化合物 (213 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) で処理して脱 N-トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物 (16) (148 mg) を得た。

¹H-n.m.r. (CD₃OD) : δ 7.93 (d, 1H, J = 6.8 Hz, H-1) 7.82 (t, 1H, H-2) 7.55 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-3) 5.42 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H-1') 5.17 (bs, 1H, H-7) 4.77 (d, 1H, J = 20.0 Hz, H-14a) 4.71 (d, 1H, J = 20.0 Hz, H-14b) 4.28 (q, 1H, J = 6.4 Hz, H-5') 4.20 (ddd, 1H, H-3') 4.03 (s, 3H, 4-OCH₃) 3.63 (s, 2H, Gly-α-CH₂) 3.61 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H-4') 3.08 (d, 1H, J = 18.7 Hz, H-10a) 2.96 (d, 1H, J = 18.7 Hz, H-10b) 2.37 (d, 1H, J = 14.4 Hz, H-8a) 2.17 (dd, 1H, J = 14.4, 5.1 Hz, H-8b) 2.05 (ddd, 1H, J = 12.7, 12.7, 3.4 Hz, H-2'a) 1.75 (dd, 1H, J = 12.7, 4.7 Hz,

H - 2' b) 1. 28 (d, 3 H, J = 6. 4 Hz, H - 6')。

参考例 10

3' - N - (G l y - P h e) - D N R · H C l (18)

参考例 6 と同様の方法により N^α - T r t - G l y - P h e (17) (140 mg、0. 30 mmol) と N - ヒドロキシコハク酸イミド (38 mg、0. 33 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液に N, N' - ジクロヘキシルカルボジイミド (68 mg、0. 33 mmol) を添加し、次いで D N R (159 mg、0. 30 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3' - N - (N^α - T r t - G l y - P h e) - D N R (174 mg) を得た。次にこの化合物 (150 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) で処理して脱 N - トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物 (18) (55 mg) を得た。

¹ H - n. m. r. (C D₃ O D) : δ 7. 97 (d, 1 H, J = 6. 8 Hz, H - 1) 7. 82 (t, 1 H, H - 2) 7. 56 (d, 1 H, J = 8. 3 Hz, H - 3) 7. 18 ~ 7. 28 (m, 5 H, P h e - a r o m a t i c) 5. 40 (d, 1 H, J = 3. 4 Hz, H - 1') 5. 12 (b s, 1 H, H - 7) 4. 64 (d d, 1 H, J = 9. 0, 5. 6 Hz, P h e - α - C H) 4. 27

(q, 1H, J = 6.6 Hz, H-5') 4.13 (dd, 1H, H-3') 4.03 (s, 3H, 4-OC₃H₃) 3.60 (d, 1H, J = 15.9 Hz, Gly- α -CHa) 3.50 (d, 1H, J = 15.9 Hz, Gly- α -CHb) 3.44 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H-4') 3.10 (dd, 1H, J = 13.9, 5.6 Hz, Phe- β -CHa) 3.05 (d, 1H, J = 18.5 Hz, H-10a) 3.00 (d, 1H, J = 18.5 Hz, H-10b) 2.94 (dd, 1H, J = 13.9, 9.0 Hz, Phe- β -CHb) 2.36 (s, 3H, H-14) 2.35 (d, 1H, J = 14.4 Hz, H-8a) 2.18 (dd, 1H, J = 14.4, 5.1 Hz, H-8b) 1.94 (ddd, 1H, J = 13.0, 12.7, 3.4 Hz, H-2'a) 1.69 (dd, 1H, J = 13.0, 4.6 Hz, H-2'b) 1.28 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H-6')。

参考例 11

3' - N - (Gly - Gly - Gly - Gly) - D
XR · HCl (20)

参考例 6 と同様の方法により N ^{α} - Trt - Gly - Gly - Gly (19) (488 mg、1.0 mmol) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (127 mg、1.1 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液

に N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (227 mg、1.1 mmol) を添加し、次いで DXR (544 mg、1.0 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3' - N - (N^α - Trt - Gly - Gly - Gly - Gly - Gly) - DXR (759 mg) を得た。次にこの化合物 (580 mg) を 75% 酢酸 (5 ml) で処理して脱 N - トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物 (20) (380 mg) を得た。

¹H - n. m. r. (CD₃OD - D₂O) : δ 7.87 (d, 1H, J = 7.3 Hz, H - 1) 7.83 (t, 1H, H - 2) 7.55 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H - 3) 5.43 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H - 1') 5.09 (bs, 1H, H - 7) 4.79 (d, 1H, J = 21.0 Hz, H - 14a) 4.74 (d, 1H, J = 21.0 Hz, H - 14b) 4.28 (q, 1H, J = 6.4 Hz, H - 5') 4.16 (ddd, 1H, H - 3') 4.04 (s, 3H, 4 - OCH₃) 4.03 (d, 1H, J = 16.6 Hz, Gly - α - CH_a) 3.98 (d, 1H, J = 16.6 Hz, Gly - α - CH_b) 3.90 (s, 2H, Gly - α - CH₂) 3.86 (s, 2H, Gly - α - CH₂) 3.81 (s, 2H, Gly - α - CH₂) 3.65 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H - 4') 3.07 (d, 1H, J = 18.6 Hz, H - 10a) 3.04 (d, 1H, J =

1 8 . 6 H z , H - 1 0 b) 2 . 3 6 (d , 1 H , J =
 1 4 . 7 H z , H - 8 a) 2 . 1 8 (d d , 1 H , J =
 1 4 . 7 , 3 . 4 H z , H - 8 b) 2 . 0 3 (d d d ,
 1 H , J = 1 2 . 7 , 1 2 . 7 , 3 . 4 H z , H - 2 ' a)
 1 . 7 5 (d d , 1 H , J = 1 2 . 7 , 3 . 9 H z ,
 H - 2 ' b) 1 . 2 9 (d , 3 H , J = 6 . 4 H z , H
 - 6 ') 。

参考例 1 2

3' - N - (G l y - L e u - P h e - G l y) - D
X R · H C l (2 2)

参考例 6 と同様の方法により N^α - T r t - G l y -
 L e u - P h e - G l y (2 1) (5 5 2 m g 、 0 . 8 7
 m m o l) と N - ヒドロキシコハク酸イミド (1 1 5 m g 、 1 .
 0 m m o l) の N , N - ジメチルホルムアミド (5 m l) 溶液
 に N , N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (2 0 6
 m g 、 1 . 0 m m o l) を添加し、次いで D X R (4 7 2 m g 、
 0 . 8 7 m m o l) の N , N - ジメチルホルムアミド (3 m l)
 溶液を加えて 3' - N - (N^α - T r t - G l y - L e
 u - P h e - G l y) - D X R (2 4 2 m g) を得た。次
 にこの化合物 (1 6 9 m g) を 7 5 % 酢酸 (3 m l) で処理
 して脱 N - トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記
 化合物 (2 2) (7 9 m g) を得た。

¹ H - n . m . r . (C D ₃ O D) : δ 7 . 9 5 (d ,
 1 H , J = 7 . 8 H z , H - 1) 7 . 8 2 (t , 1 H ,

H - 2) 7. 56 (d, 1 H, J = 8. 6 Hz, H - 3)
 7. 15 ~ 7. 25 (m, 5 H, P h e - a r o m a t
 i c) 5. 43 (d, 1 H, J = 3. 9 Hz, H - 1')
 5. 14 (b s, 1 H, H - 7) 4. 76 (d, 2 H,
 J = 20. 0 Hz, H - 14 a) 4. 71 (d, 1 H,
 J = 20. 0 Hz, H - 14 b) 4. 44 (d d, 1 H,
 J = 9. 0, 6. 4 Hz, P h e - α - C H) 4. 30
 (q, 1 H, J = 6. 6 Hz, H - 5') 4. 30 (t,
 1 H, J = 7. 3 Hz, L e u - α - C H) 4. 15
 (d d d, 1 H, H - 3') 4. 03 (s, 3 H, 4 -
 O C H₃) 3. 90 (d, 1 H, J = 16. 9 Hz, G
 l y - α - C H a) 3. 74 (d, 1 H, J = 15. 9
 Hz, G l y - α - C H a) 3. 70 (d, 1 H, J =
 15. 9 Hz, G l y - α - C H b) 3. 62 (d, 1
 H, J = 1. 5 Hz, H - 4') 3. 61 (d, 1 H,
 J = 16. 9 Hz, G l y - α - C H b) 3. 15 (d
 d, 1 H, J = 13. 9, 6. 4 Hz, P h e - β - C
 H a) 3. 10 (d, 1 H, J = 18. 7 Hz, H - 1
 0 a) 3. 01 (d, 1 H, J = 18. 7 Hz, H - 1
 0 b) 2. 96 (d d, 1 H, J = 13. 9, 9. 0 Hz
 z, P h e - β - C H b) 2. 37 (d, 1 H, J = 1
 4. 7 Hz, H - 8 a) 2. 19 (d d, 1 H, J = 1
 4. 7, 5. 1 Hz, H - 8 b) 2. 04 (d d d, 1
 H, J = 12. 7, 12. 5, 3. 9 Hz, H - 2' a)

1. 71 (dd, 1H, $J = 12.5, 4.2$ Hz, H-2' b) 1.55 (m, 1H, Leu- γ -CH) 1.43 (m, 2H, Leu- β -CH₂) 1.29 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, H-6') 0.89 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, Leu- δ -CH₃) 0.85 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, Leu- δ -CH₃)。

実施例 1

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (23)

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (1000 mg) を水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (30 ml) に溶解した。この溶液に 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR · HCl (10) (220 mg) を溶解した水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシー-1, 2-ジヒドロキノリン (1000 mg) を加えて室温で2時間攪拌した。反応液を透析膜 (分子量カットオフ 12,000 ~ 14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した後、陽イオン交換樹脂 (AG 50W-X8 (Na⁺型)、BIO-RAD) 50 ml のカラムに通し、さらに精製水に対して4℃で2日間透析した。透析内液を取り出し、凍結乾燥させて標記化合物 (23) (1085 mg) を得た。本複合体の薬物の導入

率は、478nmにおける可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.1%（重量%）であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン（検出：478nmにおける可視吸光度）はそれぞれ図1、図2に示されるとおりである。

実施例 2

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (24)

実施例1と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩(3)(450mg)の水：N，N-ジメチルホルムアミド(1：1)混合液(13.5ml)と3'-N-(Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR・HCl(10)(100mg)の水：N，N-ジメチルホルムアミド(1：1)混合液(4, 5ml)および1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(450mg)とを反応させて標記化合物(24)(420mg)を得た。本複合体の薬物の導入率は、478nmにおける可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、5.8%（重量%）であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン（検出：478nmにおける可視吸光度）はそれぞれ図3、図4に示されるとおりである。

実施例 3

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -

(G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (2 5)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (4) (6 0 0 m g) の水 : N , N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (1 8 m l) と 3 ' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H C l (1 0) (2 7 0 m g) の水 : N , N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6 m l) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1 , 2 - ジヒドロキノリン (6 0 0 m g) とを反応させて標記化合物 (2 5) (7 0 5 m g) を得た。本複合体の薬物の導入率は、4 7 8 n m における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、1 2 . 4 % (重量 %) であった。

実施例 4カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3 ' - N - (G l y - P h e - G l y - G l y) - D X R (2 6)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (1 0 0 0 m g) の水 : N , N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 0 m l) と 3 ' - N - (G l y - P h e - G l y - G l y) - D X R · H C l (1 2) (2 2 0 m g) の水 : N , N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (1 0 m l) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1 , 2 - ジヒドロキノリン (1 0 0 0 m g) とを反応させて標記化合物 (2 6) (1 0 7 0 m g) を得た。本複合体の薬物の導入率は、4

78nmにおける可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.1%（重量%）であった。

実施例 5

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(Ala - Leu - Ala - Leu) - DXR (27)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (750mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (22ml) と 3' - N - (Ala - Leu - Ala - Leu) - DXR · HC1 (14) (180mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (8ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1, 2 - ジヒドロキノリン (750mg) とを反応させて標記化合物 (27) (856mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.7%（重量%）であった。

実施例 6

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
Gly - DXR (28)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (6) (200mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6ml) と 3' - N - Gly - DXR · HC1 (16) (15mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (2ml) 及

び 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (100 mg) とを反応させて標記化合物 (28) (155 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、3.1% (重量%) であった。

実施例 7

カルボキシメチルプルランナトリウム塩-3'-N-Gly-DXR (29)

透析膜として分子量カットオフ 1,000 の透析膜 (スペクトラム社製) を用いた以外は実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (8) (100 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) と 3'-N-Gly-DXR · HCl (16) (40 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (2 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (100 mg) とを反応させて標記化合物 (29) (111 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、12.6% (重量%) であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図 5、図 6 に示されるとおりである。

実施例 8

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(G l y - P h e) - D N R (30)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (200 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6 ml) と 3' - N - (G l y - P h e) - D N R · H C l (18) (32 mg) の水 : N, N' - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (2 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシー - 1, 2 - ジヒドロキノリン (200 mg) とを反応させて標記化合物 (30) (185 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、5.6% (重量%) であった。

実施例 9

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(G l y - G l y - G l y - G l y) - D X R (31)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (300 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (9 ml) と 3' - N - (G l y - G l y - G l y - G l y) - D X R · H C l (20) (63 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシー - 1, 2 - ジヒドロキノリン (300 mg) とを反応させて標記化合物 (31) (330 mg)

を得た。本複合体の薬物の導入率は、478nmにおける可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.9%（重量%）であった。

実施例 10

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(G l y - L e u - P h e - G l y) - D X R (32)

実施例1と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩(2)(200mg)の水：N，N-ジメチルホルムアミド(1：1)混合液(6ml)と3'-N-(G l y - L e u - P h e - G l y) - D X R · H C l (22)(48mg)の水：N，N-ジメチルホルムアミド(1：1)混合液(2ml)および1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1，2-ジヒドロキノリン(200mg)とを反応させて標記化合物(32)(183mg)を得た。本複合体の薬物の導入率は、478nmにおける可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.2%（重量%）であった。

実施例 11

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (33)

実施例1と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩(4)(400mg)の水：N，N-ジメチルホルムアミド(1：1)混合液(12ml)と3'-N-(G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H

C 1 (10) (88 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (4 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (400 mg) とを反応させて標記化合物 (33) (348 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、7.3% (重量%) であった。

実施例 12

カルボキシメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (34)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルプルランナトリウム塩 (2) (200 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6 ml) と 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR · HCl (10) (88 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (4 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (200 mg) とを反応させて標記化合物 (34) (251 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、11.0% (重量%) であった。

参考例 13

3' - N - (Gly)₆ - DXR · HCl (36)

参考例 6 と同様の方法により N^α - Trt -

(Gly)₆-OH (240 mg, 0.4 mmol) (35) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (57 mg, 0.5 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液に N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (103 mg, 0.5 mmol) を添加し、次いで DXR (217 mg, 0.4 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて、3'-N[N^α-Trt-(Gly)₆-DXR (177 mg) を得た。この化合物 (167 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) で処理して脱 N-トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して標記化合物 (36) (98 mg) を得た。

¹H-n.m.r. (CD₃OD-D₂O) : δ 7.73 (t, 1H, H-2) 7.69 (d, 1H, J=6.6 Hz, H-1) 7.42 (d, 1H, J=8.3 Hz, H-3) 5.41 (bs, 1H, H-1') 4.98 (bs, 1H, H-7) 4.81 (d, 1H, J=20.3 Hz, H-14a) 4.70 (d, 1H, J=20.3 Hz, H-14b) 4.26 (q, 1H, J=6.6 Hz, H-5') 4.16 (ddd, 1H, H-3') 4.02 (s, 2H, Gly-α-CH₂) 3.98 (s, 3H, 4-OCH₃) 3.96 (s, 4H, Gly-α-CH₂ x 2) 3.92 (s, 2H, Gly-α-CH₂) 3.91 (d, 1H, J=17.1 Hz, Gly-α-CHa) 3.87 (d,

1 H, J = 17. 1 Hz, Gly - α - CH b) 3. 85 (s, 2 H, Gly - α - CH₂) 3. 68
 (d, 1 H, J = 1. 5 Hz, H - 4') 2. 98 (d, 1 H, J = 18. 1 Hz, H - 10 a) 2. 76 (d, 1 H, J = 18. 1 Hz, H - 10 b) 2. 34 (d, 1 H, J = 14. 2 Hz, H - 8 a) 2. 13 (dd, 1 H, J = 13. 9, 3. 7 Hz, H - 8 b) 2. 03
 (ddd, 1 H, J = 13. 2, 13. 2, 3. 9 Hz, H - 2' a) 1. 76 (dd, 1 H, J = 11. 9, 3. 3 Hz, H - 2' b) 1. 30 (d, 3 H, J = 6. 6 Hz, H - 6').

参考例 14

3' - N - (Phe - Gly) - DXR · HCl

(38)

参考例 6 と同様の方法により N ^{α} - Trt - (Phe - Gly) - OH (232 mg、0. 5 mmol) (37) と N - ヒドロキシコハク酸イミド (63 mg、0. 55 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (4 ml) 溶液に N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (113 mg、0. 55 mmol) を添加し、次いで DXR (272 mg、0. 5 mmol) の N, N - ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液を加えて 3' - N - (N ^{α} - Trt - Phe - Gly) - DXR (214 mg) を得た。この化合物 (200 mg) を 75% 酢酸 (3 ml) で処理し

て脱N-トリチル化を行い、塩酸塩へ変換して、標記化合物(38)(98mg)を得た。

$^1\text{H-n.m.r. (CD}_3\text{OD)}$: δ 7.89 (d, 1H, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-1) 7.79 (t, 1H, H-2) 7.52 (d, 1H, $J = 8.3 \text{ Hz}$, H-3) 7.21 ~ 7.30 (m, 5H, Phe-aromatic) 5.41 (d, 1H, $J = 3.7 \text{ Hz}$, H-1') 5.11 (bs, 1H, H-7) 4.76 (d, 2H, $J = 19.9 \text{ Hz}$, H-14a) 4.71 (d, 1H, $J = 19.9 \text{ Hz}$, H-14b) 4.27 (q, 1H, $J = 6.4 \text{ Hz}$, H-5') 4.16 (ddd, 1H, H-3') 4.05 (dd, 1H, $J = 8.1, 6.4 \text{ Hz}$, Phe- α -CH) 4.02 (s, 3H, 4-OCH₃) 3.92 (d, 1H, $J = 16.5 \text{ Hz}$, Gly- α -CHa) 3.75 (d, 1H, $J = 16.5 \text{ Hz}$, Gly- α -CHb) 3.60 (d, 1H, $J = 1.5 \text{ Hz}$, H-4') 3.18 (dd, 1H, $J = 14.0, 6.4 \text{ Hz}$, Phe- β -CHa) 3.05 (d, 1H, $J = 18.7 \text{ Hz}$, H-10a) 2.98 (dd, 1H, $J = 14.0, 8.1 \text{ Hz}$, Phe- β -CHb) 2.92 (d, 1H, $J = 18.7 \text{ Hz}$, H-10b) 2.36 (d, 1H, $J = 14.4 \text{ Hz}$, H-8a) 2.17 (dd, 1H, $J = 14.4, 4.6 \text{ Hz}$, H-8b) 1.97 (ddd, 1H, $J = 13.2,$

13.2, 3.9 Hz, H-2' a) 1.73 (dd, 1H, J = 13.2, 4.6 Hz, H-2' b) 1.27 (d, 3H, J = 6.4 Hz, H-6')。

実施例 13

カルボキシルメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N - (Gly) ₆ DXR (39)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシルメチルプルランナトリウム塩 (2) (300 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (9 ml) と 3' - N - (Gly) ₆ - DXR · HCl (36) (66 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (6 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシー - 1, 2 - ジヒドロキノリン (300 mg) とを反応させて標記化合物 (39) (327 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.3% (重量%) であった。

実施例 14

カルボキシルメチルプルランナトリウム塩 - 3' - N - (Phe - Gly) - DXR (40)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシルメチルプルランナトリウム塩 (2) (250 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (7.5 ml) と 3' - N - (Phe - Gly) - DXR · HCl (3

8) (45 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (2.5 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (250 mg) とを反応させて標記化合物 (40) (223 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.5% (重量%) であった。

参考例 15

スクシニルプルランナトリウム塩 (41)

プルラン (1) (3.2 g、重量平均分子量 : 約 15 万) (株式会社林原生物化学研究所製) および塩化リチウム (2.5 g) を N, N-ジメチルホルムアミド (30 ml) に溶解した。次に無水コハク酸 (3.0 g) および N-メチルモルホリン (3.03 g) を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応後、メタノール (100 ml) を添加し、遠心分離した後、析出した沈殿物を水 (30 ml) に溶解した。陽イオン交換樹脂 (AG 50W-X 8 (Na⁺ 型)、BIO-RAD) 50 ml のカラムに通し、さらに精製水に対して 4℃ で 2 日間透析した後、透析内液を取り出し、凍結乾燥してスクシニルプルランナトリウム塩 (41) (2.31 g) を得た。この物質の糖残基当りのスクシニル化度は、アルカリ滴定法から 0.7 であった。

実施例 15

スクシニルプルランナトリウム塩 - 3' - N -
(G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (42)

実施例 1 と同様の方法によりスクシニルプルランナトリウム塩 (41) (300 mg) を水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (9 ml) と 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H C l (10) (66 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1, 2 - ジヒドロキノリン (300 mg) とを反応させて標記化合物 (42) (327 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.8% (重量%) であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図 7、図 8 に示されるとおりである。

参考例 16

低分子量カルボキシメチルキチンナトリウム塩 (43)

カルボキシメチルキチン (カルボキシメチル化度 : 0.7、片倉チッカリン製) (20.0 g) を 50 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) (2 リットル) に溶解し、37℃ に加温した。この溶液に精製水に溶解したリゾチーム (卵白由来, 51,500 Units / mg solid, 生化学工業製) (60 mg) を加え、37℃ で

2. 5時間攪拌した。反応液を99.5%エタノール(1.2リットル)に加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥して、白色非晶質の(17.6g)を得た。

このカルボキシメチルキチン(17.6g)を精製水(1.2リットル)に溶解し、氷冷下、水素化ホウ素ナトリウム(2.64g)を3回に分けて加え、その後4℃で終夜攪拌した。反応液に塩酸を加えpH4.0に調整した後、水酸化ナトリウム溶液を加えpH8.1に調整した。この溶液をメンブランフィルター(0.3 μ m)に通し、99.5%エタノール(10リットル)に加えた。生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、還元末端が還元されたカルボキシメチルキチンナトリウム(14.4g)を得た。

次に、この還元末端が還元されたカルボキシメチルキチンナトリウム(4.0g)を0.2M塩化ナトリウム溶液(400ml)に溶解し、あらかじめ0.2M塩化ナトリウム溶液で平衡化した陰イオン交換樹脂(AG1-X2(C1型)、BIO-RAD)240mlのカラムに添加した。次に種々の濃度の塩化ナトリウム水溶液で段階的に溶出した。0.4M塩化ナトリウム溶液による溶出液を99.5%エタノール(3.5リットル)に加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、さらに低分子化したカ

ルボキシメチルキチンナトリウム (713 mg) を得た。

こうして得られたカルボキシメチルキチンナトリウム (600 mg) を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (60 ml) に溶解し、無水酢酸 (2.4 ml) を4回に分けて加え、その後4℃で終夜攪拌した。反応液を透析膜 (分子量カットオフ12,000~14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として4℃で3日間透析した。反応液をメンブランフィルター (0.22 μm) に通し、この溶液を99.5%エタノール (600 ml) に加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、標記化合物 (43) (550 mg) を得た。デキストランを標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約7万であった。

実施例 16

カルボキシメチルキチンナトリウム塩 - 3' - N -
(Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (44)

実施例1と同様の方法によりカルボキシメチルキトサンナトリウム塩 (43) (100 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) と、3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR · HCl (10) (10.4 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (1 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1, 2 - ジヒ

ドロキノリン (100 mg) とを反応させて標題化合物 (44) (96 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、2.7% (重量%) であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出: 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図9、図10に示される通りである。

参考例 17

カルボキシメチルデキストランナトリウム塩 (45)

デキストラン (分子量約7万、ファルマシア製) (1.0 g) を6N水酸化ナトリウム溶液 (8.3 ml) に、溶解し70℃に加熱した。モノクロロ酢酸 (2.0 g) を加えて70℃で20分間攪拌した。反応液を氷冷後、酢酸を加えpH 8.5に調整し、この溶液をメタノール (500 ml) に加えた。反応液を生じた沈殿を精製水 (20 ml) に溶解し、透析膜 (分子量カットオフ12,000~14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として4℃で2日間透析した。透析内液をとり出し、凍結乾燥して、標記化合物 (45) (0.9 g) を得た。この物質の糖残基当りカルボキシメチル化度はアルカリ滴定から0.6であった。

実施例 17

カルボキシメチルデキストランナトリウム塩 - 3' -
N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (4

6)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルデキストランナトリウム塩 (45) (300 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (9 ml) と、3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR・HCl (10) (66 mg) の水 : N, N-ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシー-1, 2-ジヒドロキノリン (300 mg) とを反応させて標題化合物 (46) (297 mg) を得た。複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、5.7% (重量%) であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図 11、図 12 に示される通りである。

参考例 18低分子量カルボキシメチルマンノグルカン (47)

放線菌ミクロエロスポリアテ・グリゼアの培養液より分離して得られるマンノグルカン (7.0 g) を 0.1 N 塩酸 (280 ml) に溶解し、80℃で7.5時間加熱した。反応液を氷冷下、5 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調製し、99.5% エタノール 900 ml) に加えた。生じた沈殿を 95% エタノールで洗い、次いで精製水 (450 ml) に溶解した。この溶液を陽

イオン交換樹脂（AG50W-X2（H⁺型）、BIO-RAD）60mlのカラムに添加し、溶出液をさらに陰イオン交換樹脂（AG1-X2（Cl⁻型）、BIO-RAD）60mlのカラムに添加した。最終溶出液を250mlに減圧下濃縮し、99.5%エタノール（800ml）に加えた。生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、低分子量マンノグルカン（6.02g）を得た。

こうして得られた低分子量マンノグルカン（3.98g）を、1M塩化ナトリウム溶液（400ml）に溶解し、次にメタノール（533ml）を加えた。生じた沈殿を精製水（100, 1）に溶解し、99.5%エタノール（400ml）に加えた。生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、低分子量マンノグルカン（2.0g）を得た。

この低分子量マンノグルカン（1.80g）に精製水（72ml）および水酸化ナトリウム（12.6g）を加え溶解した。氷冷下、この溶液にクロロ酢酸（18.0mg）を加え、室温下20時間攪拌した。反応液に酢酸を加え、pH8.0に調整し、次に反応液をメタノール（360ml）に加えた。生じた沈殿をメタノール、セトン、エーテルの順で洗い、減圧下乾燥し、低分子量カルボキシメチルマンノグルカンナトリウム塩（2.23g）を得た。

カルボキシメチル化をさらに 1 回繰り返して標記化合物 (2.25 g) を得た。デキストランを標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 11 万であった。この物質の糖残基当りのカルボキシメチル化度はアルカリ滴定から 0.8 であった。

実施例 18

カルボキシメチルマンノグルカンナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R
(48)

実施例 1 と同様の方法によりカルボキシメチルマンノグルカンナトリウム塩 (47) (100 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) と、3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H C l (10) (11.9 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (1 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシ - 1, 2 - ジヒドロキノリン (100 mg) とを反応させて標題化合物 (48) (99 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、4.5% (重量%) であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図 13、図 14 に示される通りである。

参考例 19

N - アセチル - 脱 N - 硫酸化ヘパリン (49)

脱 N - 硫酸化 - ヘパリンナトリウム塩 (1.0 g、ブタ腸由来、シグマ社製) を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (100 ml) に溶かし、無水酢酸 (4 ml) を 15 分おきに 4 回に分けて加え、その後 4℃ で終夜攪拌した。反応液に酢酸を加え、pH 6.5 に調整した後、99.5% エタノール (700 ml) に加え、生じた沈殿を蒸留水 (50 ml) に溶かし、メンブランフィルター (0.22 μm) を通した。この溶出液を 99.5% エタノール (400 ml) に加え、生じた沈殿を 95% エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥し、白色非晶質の N - アセチル - 脱 N - 硫酸化ヘパリンナトリウム塩 (49) (900 mg) を得た。デキストランを標準とするゲルろ過法により求めた分子量は約 4 万であった。

実施例 19

N - アセチル - 脱 N - 硫酸化ヘパリンナトリウム塩 -
(G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R 複合体
(50)

N アセチル - 脱 N - 硫酸化ヘパリンナトリウム塩 (49) (340 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (20 ml) と 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H C l (10) (75 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 :

1) 混合液 10 ml および 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (340 mg) を加えて室温で3時間攪拌した。反応液を透析膜 (分子量カットオフ 12,000~14,000、スペクトラム社製) を用いて、精製水を外液として4℃で3日間透析した。透析内液を陽イオン交換樹脂 (AG 50W-X8 (Na⁺型)、BIO-RAD) 20 ml のカラムに通し、さらにメンブランフィルター (0.45 μm) を通した。この溶出液を99.5%エタノール (400 ml) に加え、生じた沈殿を95%エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥した。生じた残渣を精製水 20 ml に溶かした後、メンブランフィルター (0.45 μm) を通し、凍結乾燥することにより、標題化合物 (50) (328 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、4.2%であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出: 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図15、図16に示される通りである。

参考例 20

低分子量ヒアルロン酸ナトリウム塩 (51) (52)

ヒアルロン酸ナトリウム関節内注射液 (鶏冠由来、重量平均分子量: 60万~120万、生化学工業・科研製薬製、25 mg/2.5 ml 溶液) 110 ml に、1.5 M

塩化ナトリウム - 1 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) (11 ml) を加え 37℃ に加温した。この溶液に、氷冷した精製水に溶解したヒアルロニダーゼ 2200 U (羊睾丸由来、2400 Units/mg solid, シグマ社製) を加え、37℃ で 2 時間攪拌した。反応液を 99.5% エタノール (1.4 リットル) に加え、生じた沈殿を蒸留水 20 ml に溶かし、メンブランフィルター (0.45 μ m) を通した。この溶出液を 99.5% エタノール (200 ml) に加え、生じた沈殿を 95% エタノール、アセトン、エーテルの順で洗浄し、減圧下乾燥し、白色非晶質のヒアルロン酸ナトリウム塩 (991 mg) を得た。

次に、このヒアルロン酸ナトリウム塩 (700 mg) を 0.1 M 塩化ナトリウム溶液 (70 ml) に溶解し、あらかじめ 0.1 M 塩化ナトリウム溶液で平衡化した陰イオン交換樹脂 (AGMP-1 (Cl⁻型)、BIO-RAD) 70 ml のカラムに添加した。次いで種々の塩濃度で溶出することにより、塩濃度に対応した分子量のヒアルロン酸を含む 4 つの画分を得た。これらの溶出液をそれぞれ 99.5% エタノール (1.5 リットル) に加え、生じた沈殿を蒸留水 (10 ml) に溶かし、メンブランフィルター (0.22 μ m) を通した。この溶出液を 99.5% エタノール (100 ml) に加え、生じた沈殿を 95% エタノール、アセトン、エーテルの順で

洗浄し、減圧下乾燥し、ヒアルロン酸ナトリウム塩をそれぞれ (51) 255 mg、(52) 173 mg、109 mg、84 mg 得た。デキストランを標準とするゲルろ過法により求めた分子量はそれぞれ約 8 万、17 万、27 万、41 万であった。

実施例 20

ヒアルロン酸ナトリウム塩 - 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (53)

実施例 19 の方法と同様の方法によりヒアルロン酸ナトリウム塩 (150 mg) (51) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (12 ml) と 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR · HCl (10) (33 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (3 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシー - 1, 2 - ジヒドロキノリン 150 mg とを反応させて標記化合物 (53) (164 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、6.2% であった。本複合体の紫外・可視部吸収スペクトルとゲルろ過溶出パターン (検出 : 478 nm における可視吸光度) はそれぞれ図 17、図 18 に示される通りである。

実施例 21

ヒアルロン酸ナトリウム塩 - 3' - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR (53)

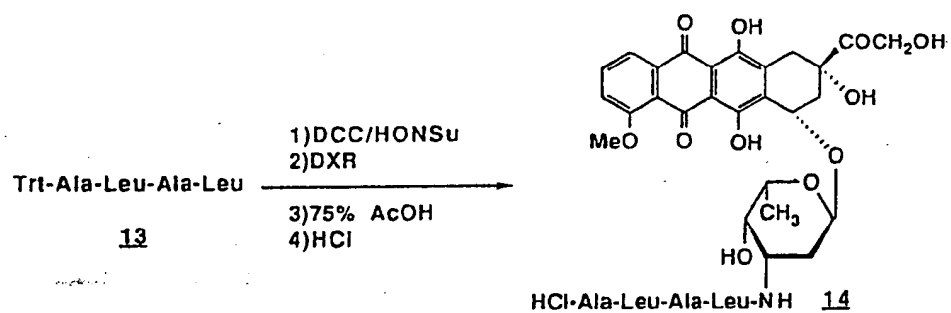
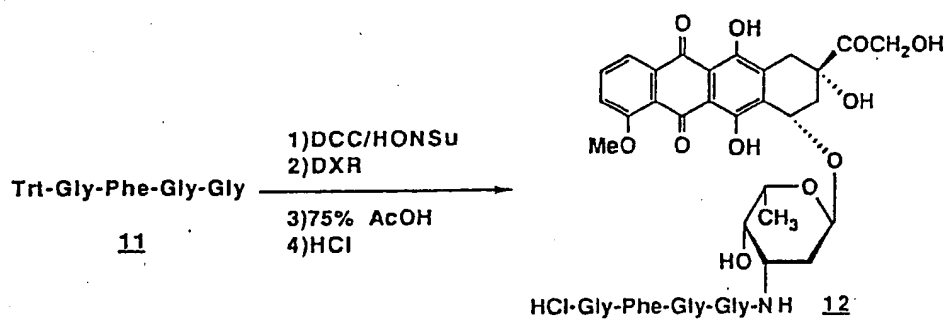
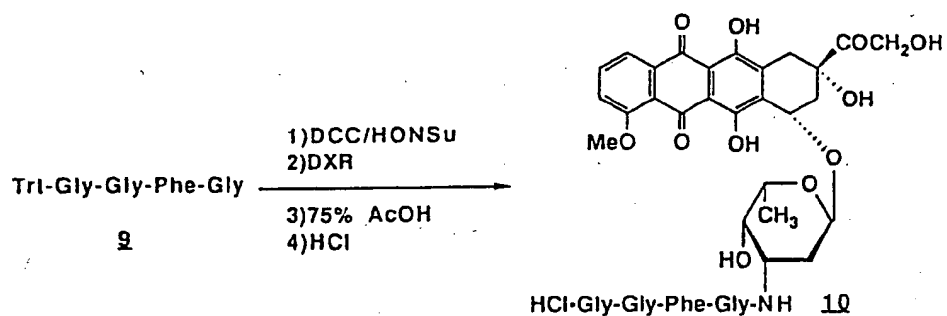
l y - P h e - G l y) - D X R (5 4)

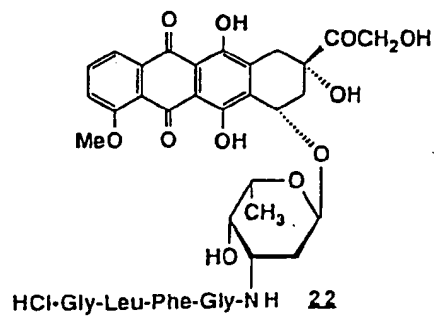
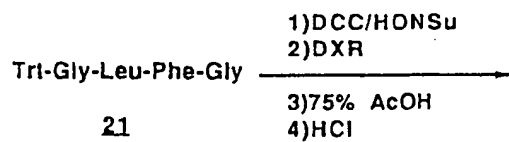
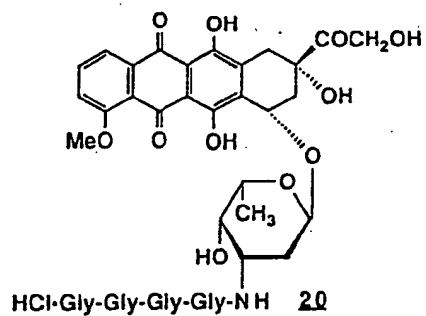
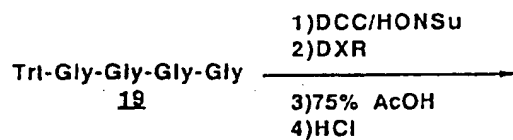
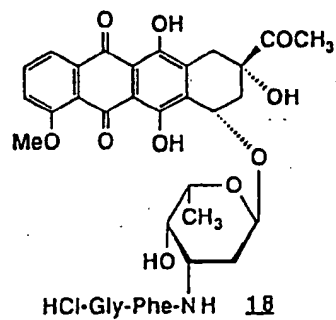
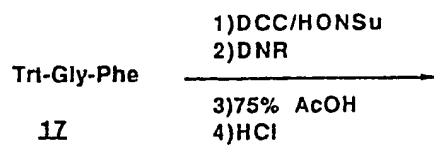
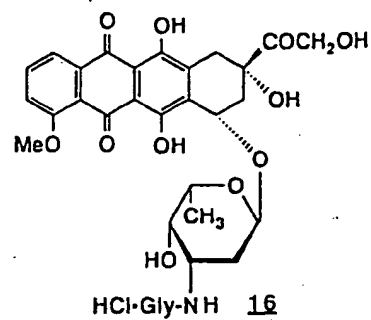
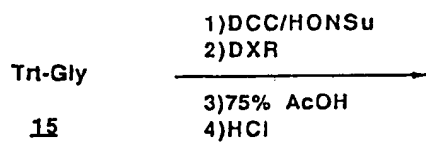
ヒアルロン酸ナトリウム塩 (51) の代わりにヒアルロン酸ナトリウム塩 (52) を用いた以外は実施例 20 と同様の方法で反応を行い、標記化合物 (54) (163 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、5.7% であった。

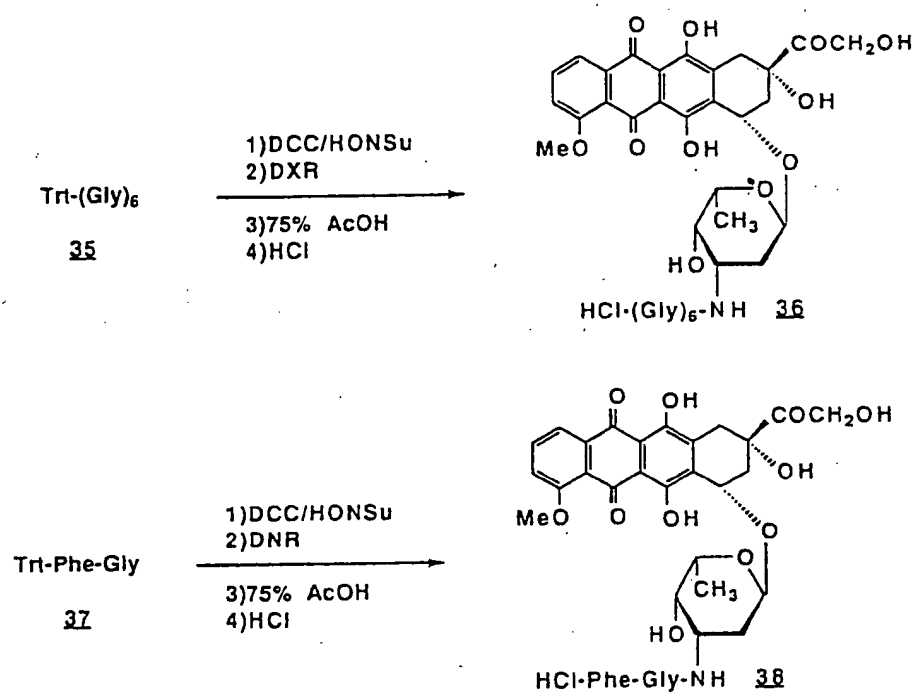
実施例 22ヒアルロン酸ナトリウム塩 - 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R (5 5)

実施例 19 と同様の方法によりヒアルロン酸ナトリウム塩 (100 mg) (ブタ皮由来、Mw = 4 万 ~ 6 万、生化学工業製) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (12 ml) と 3' - N - (G l y - G l y - P h e - G l y) - D X R · H C l (10) (22 mg) の水 : N, N - ジメチルホルムアミド (1 : 1) 混合液 (2 ml) および 1 - エトキシカルボニル - 2 - エトキシー - 1, 2 - ジヒドロキノリン (100 mg) を反応させて標記化合物 (55) (87 mg) を得た。本複合体の薬物の導入率は、478 nm における可視吸光度および複合体の総重量から算出したところ、5.4% であった。

参考例の一部をスキームとして表わすと以下のとおりである。







実験例 1

抗腫瘍効果

ウォーカー 256 ラット乳癌細胞 1×10^7 個を、ウィスター系の雌性ラット（6週令、 110 ± 10 g）の鼠径部筋肉内に移植し、3日後に被検化合物として実施例 5 で得た化合物（27）、実施例 1 で得た化合物（23）またはドキソルビシン塩酸塩を生理食塩水に溶解したものを、1群5匹として尾静脈内に投与した。なお投与量はドキソルビシン換算で 51, 2, 128, 320, 800 μ g/kg とした。

癌移植 7 日後に、ラットを放血死させ、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定することにより、抗腫瘍効果を判定した。

投与量と腫瘍重量の関係は図 19 に示される通りであった。図 19 から明らかなようにいずれの投与量の場合も、ドキソルビシンと比較して本発明による薬物複合体は優れた抗腫瘍効果を示した。

実験例 2

ラットの体重推移

ウィスター系の雌性ラット（6週令、 110 ± 10 g）を用いて、被検化合物として実施例 5 で得た化合物（27）、実施例 1 で得た化合物（23）またはドキソルビシンを生理食塩水に溶解したものを、1群5匹として 10 mg/kg 尾静脈内に投与した。投与後から体重推移および延命を調べ、毒性・副作用の指標とした。試料投与後

のラットの体重推移は試料投与時の体重に対する百分率で示した。

10 mg/kg投与群のラットの体重変化は図20に示される通りである。ドキソルビシンならびに本発明による薬物複合体は、投与後初期に体重がやや低下する傾向が見られたがドキソルビシンに比べてその程度は軽度であった。さらに薬物複合体投与群では、その後体重が増加し、複合体投与後10日前後には投与時の体重まで回復した。一方、ドキソルビシン投与群においては投与時の体重に回復せず死亡例も認められた。

以上の結果より、本発明による複合体にあっては抗腫瘍活性の増大と、毒性・副作用の減少が認められる。従って本発明による薬物複合体は治療係数の向上した有用な高分子医薬となりうることが示唆された。

請 求 の 範 囲

1. カルボキシル基を有する多糖の一部または全部のカルボキシル基に、1～8個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖が導入されてなり、前記ペプチド鎖のカルボキシル基との結合に関与していないアミノ基またはカルボキシル基の一部または全部が、カルボキシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミド結合またはエステル結合していてもよい、多糖誘導体およびその塩。

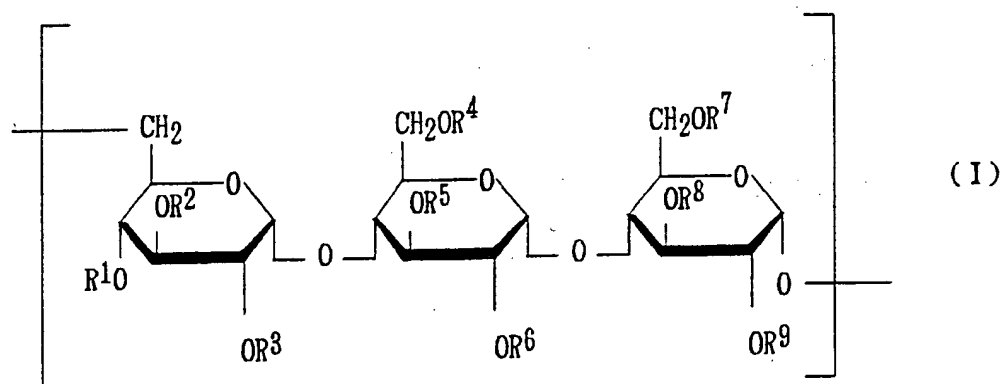
2. カルボキシル基を有する多糖が、その一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ C₁₋₄ アルキル基で置換されまたはその一部もしくは全部の水酸基にエステル結合を介して多塩基性酸が導入されてなるもの、である請求の範囲第1項に記載の多糖誘導体およびその塩。

3. その一部もしくは全部の水酸基の水素原子がカルボキシ C₁₋₄ アルキル基で置換されまたはその一部もしくは全部の水酸基にエステル結合を介して多塩基性酸が導入される前記多糖が、ブルラン、デキストラン、マンノグルカン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラビナンから選択されるものである、請求の範囲第2項に記載の多糖誘導体およびその塩。

4. カルボキシ C₁ - 4 アルキル基がカルボキシメチル基である、請求の範囲第3項記載の多糖誘導体およびその塩。

5. 多塩基性酸が、コハク酸、マレイン酸、グルタール酸、アジピン酸、シトラコン酸、シスアコニット酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、マロン酸、フマル酸、ジグリコール酸から選択されるものである、請求の範囲第3項に記載の多糖誘導体およびその塩。

6. 前記多糖がプルランである多糖誘導体であって、そのプルラン部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ であり、下記的一般式 (I) で表される繰り返し単位を含んでなる、請求項第1項～第5項いずれか一項に記載の多糖誘導体およびその塩。



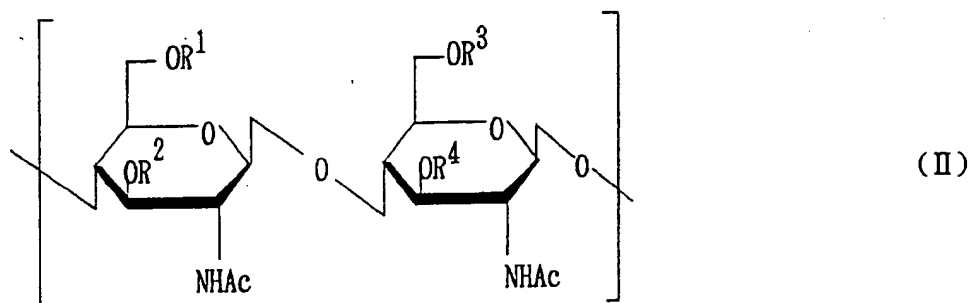
(上記式中、R¹ - 9 は、同一または異なっているとしてもよく、それぞれ水素原子、
基 - (CH₂)_m - CO - X、

基 $-CO-(CH_2)_n-CO-X$ 、または
 基 $-CO-A-CO-X$ (ここで、 $-CO-A-CO-$
 は多塩基性酸の二個のカルボキシル基の水酸基が除かれ
 た多塩基性酸残基を表す)を表し、

ここで、Xは、水素原子または1～8個の同一もしくは
 異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表し、該ペ
 プチド鎖のカルボキシル基との結合に関与していないアミ
 ノ基またはカルボキシル基の一部または全部は、カルボ
 キシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の
 該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミド
 結合またはエステル結合していてもよく、

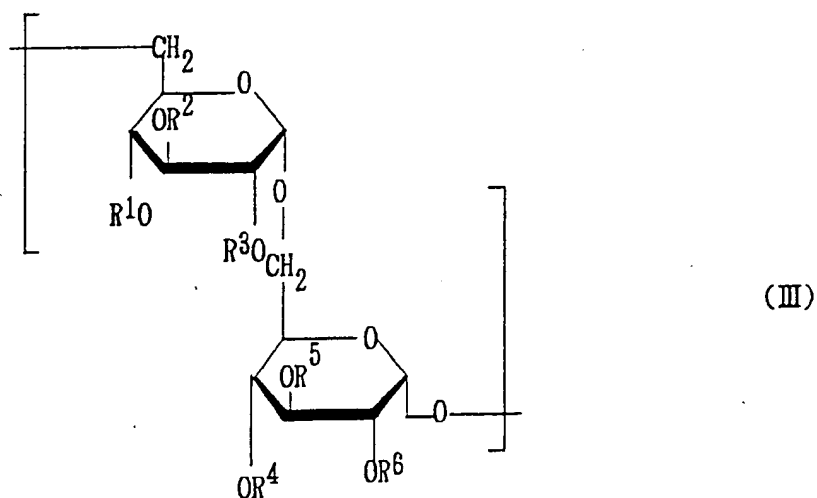
mは1～4の整数を表し、nは1～4の整数を表す)

7. 前記多糖がキチンである多糖誘導体であって、
 そのキチン部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ であ
 り、下記的一般式(II)で表される繰り返し単位を含ん
 でなる、請求項第1項～第5項いずれか一項に記載の多
 糖誘導体およびその塩。



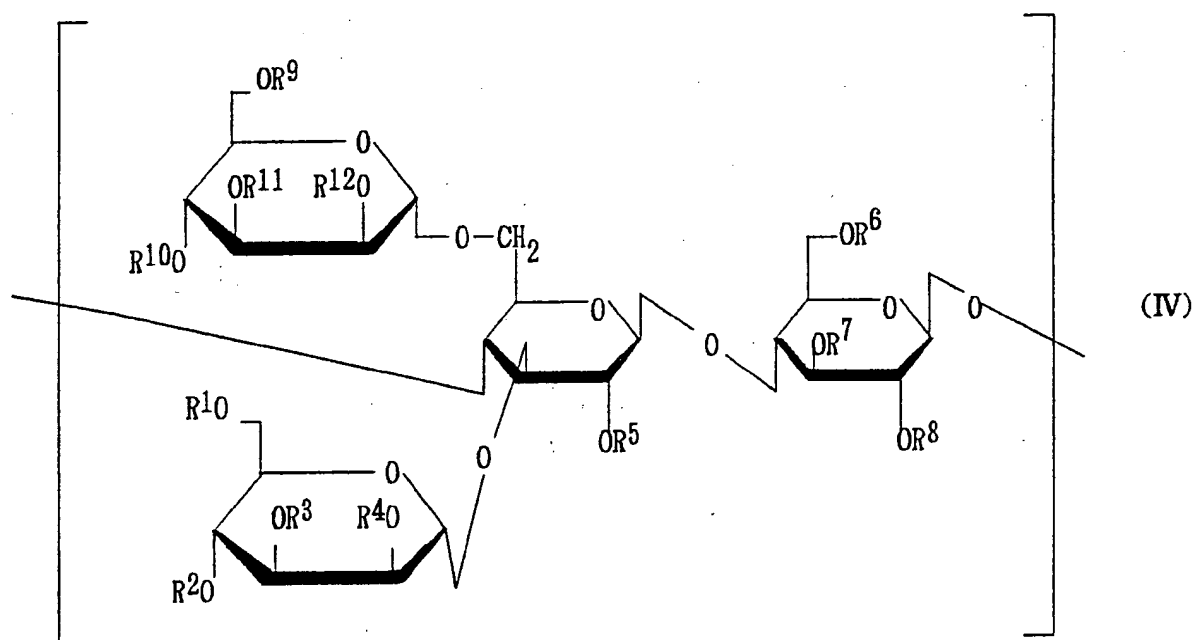
(上記式中、 $R^1 - 4$ は、同一または異なっているとしてもよく、それぞれ請求の範囲第6項で定義されたものと同一内容の基を表す)

8. 前記多糖がデキストランである多糖誘導体であって、そのデキストラン部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$ であり、下記的一般式 (III) で表される繰り返し単位を含んでなる、請求の範囲第1項～第5項いずれか一項に記載の多糖誘導体およびその塩。



(上記式中、 $R^1 - 6$ は、同一または異なっているてもよく、それぞれ請求の範囲第6項で定義されたものと同一内容の基を表す)

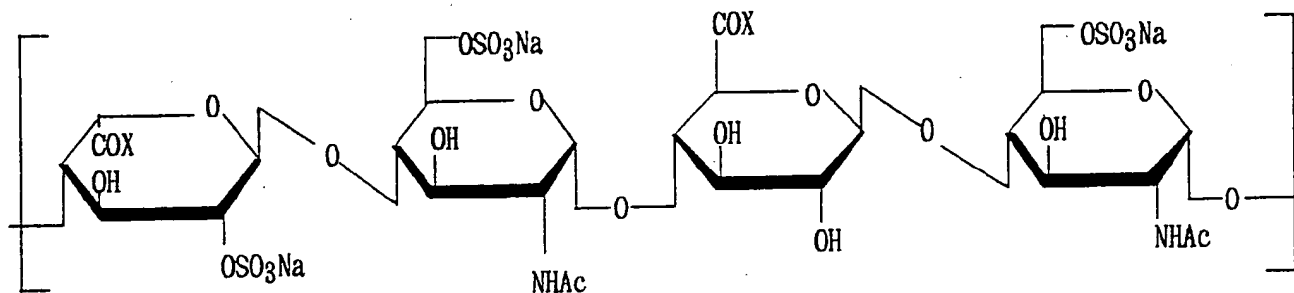
9. 前記多糖がマンノグルカンである多糖誘導体であって、そのマンノグルカン部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$ であり、下記的一般式 (IV) で表される繰り返し単位を含んでなる、請求の範囲第1項～第5項いずれか一項に記載の多糖誘導体およびその塩。



(上記式中、 $R^1 - 9$ は、同一または異なっているてもよく、それぞれ請求の範囲第3項で定義されたものと同一内容の基を表し、 $R^{10} - 12$ は同一または異なっているてもよく、それぞれ $R^1 - 9$ と同一内容の基を表す)

10. カルボキシル基を有する多糖が、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、N-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリンから選択されるものである、請求の範囲第1項に記載の多糖誘導体およびその塩。

11. 前記多糖がN-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリンである多糖誘導体であって、そのヘパリン部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ あり、下記的一般式(V)で表される繰り返し単位を含んでなる、請求の範囲第10項に記載の多糖誘導体およびその塩。

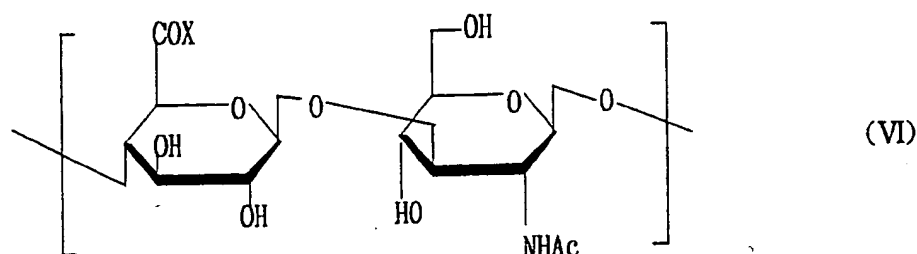


(V)

(上記式中、Xは1～8個の同一または異なるアミノ酸を含んでなるペプチド鎖を表し、該ペプチド鎖の、N-アセチル-脱N-硫酸化ヘパリンとの結合に関与していないアミノ基またはカルボキシル基の一部または全部は、カルボキシル基、アミノ基または水酸基を有する他の化合物の該カルボキシル基、アミノ基または水酸基と、酸アミ

ド結合またはエステル結合していてもよい)

12. 前記多糖がヒアルロン酸である多糖誘導体であって、そのヒアルロン酸部分の分子量が $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ であり、下記の一般式 (VI) で表される繰り返し単位を含んでなる、請求の範囲第10項に記載の多糖誘導体およびその塩。



(上記式中、Xは請求の範囲第11項で定義されたものと同一内容のペプチドを表す)

13. ペプチドが2～4個のアミノ酸からなるものである、請求の範囲第1項～第12項に記載の多糖誘導体およびその塩。

14. アミノ基、カルボキシル基または水酸基を有する他の化合物が薬物である、請求の範囲第1項～第13項に記載の多糖誘導体およびその塩。

15. 薬物が抗腫瘍剤である、請求の範囲第14項に記載の多糖誘導体およびその塩。

16. 抗腫瘍剤がドキソルビシン、ダウノルビシンから選択されるものである請求の範囲第15項に記載の

多糖誘導体およびその塩。

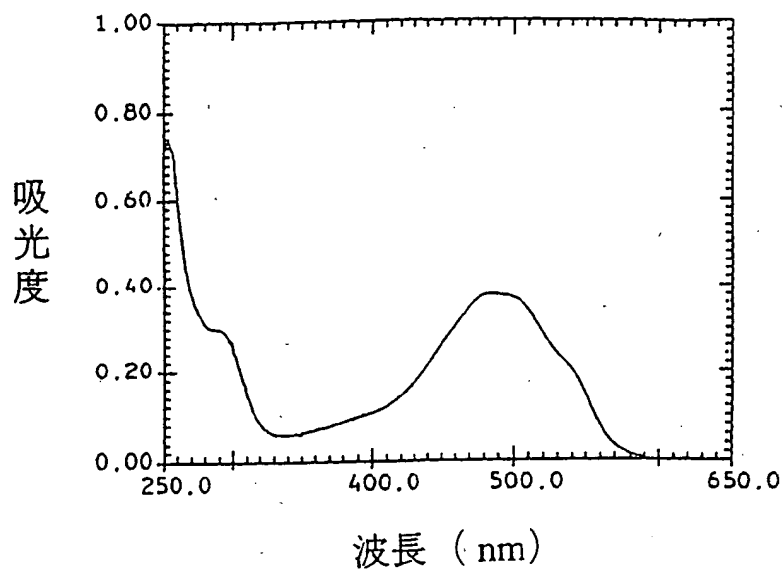


FIG. 1

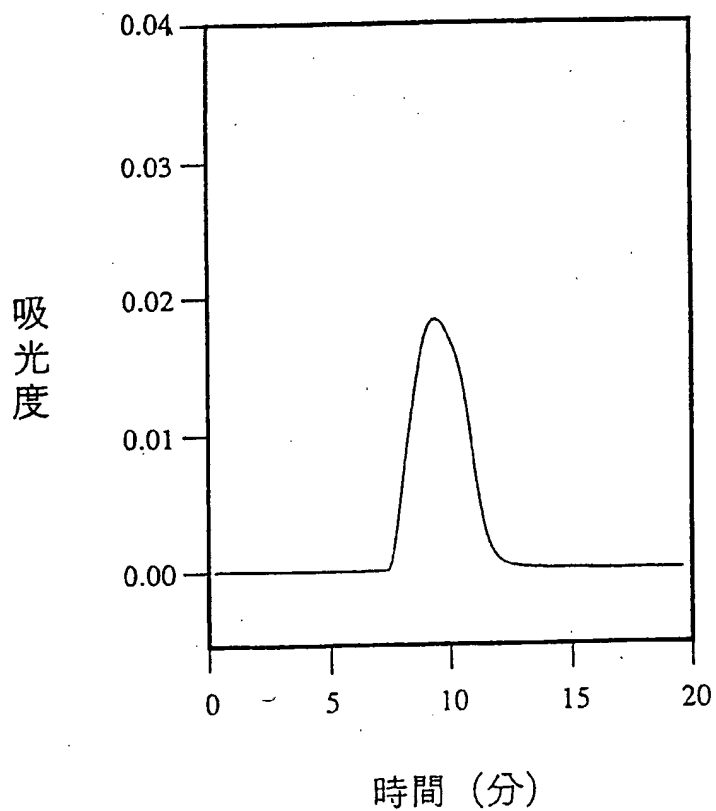


FIG. 2

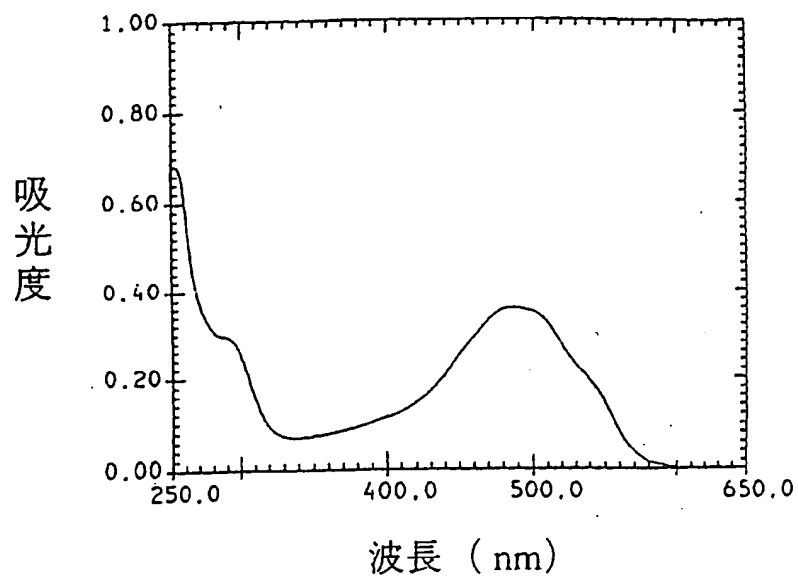


FIG. 3

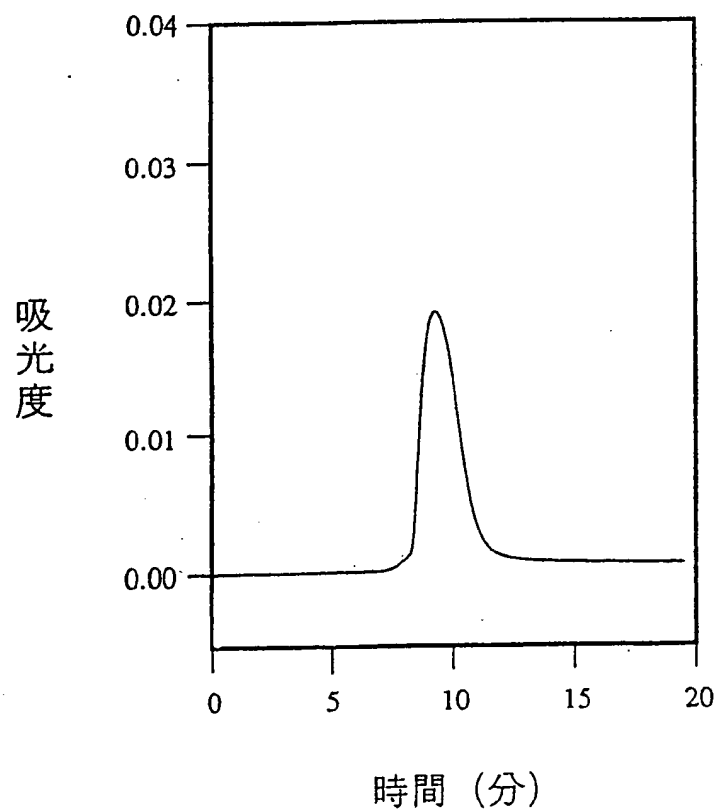


FIG. 4

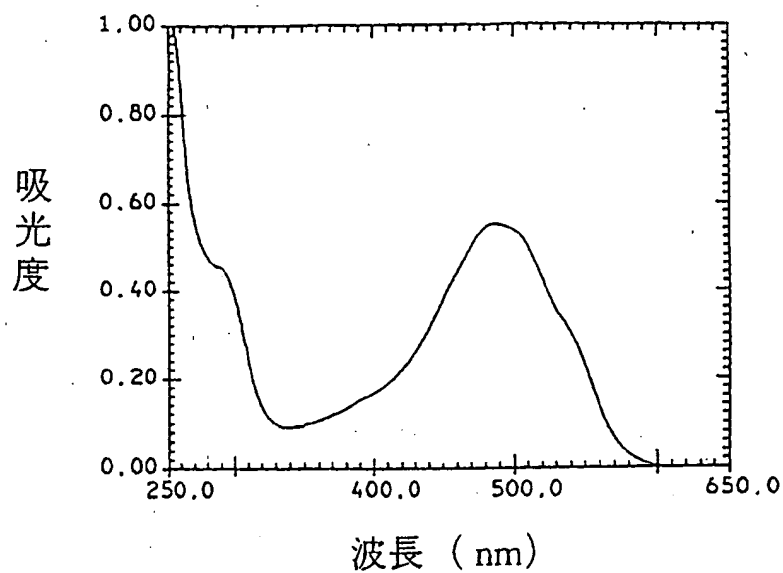


FIG. 5

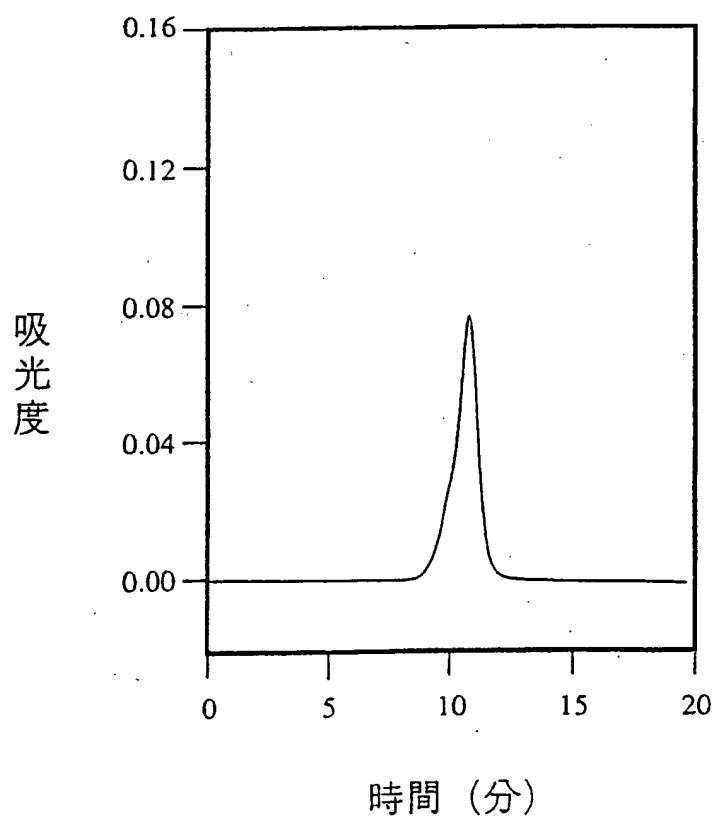


FIG. 6

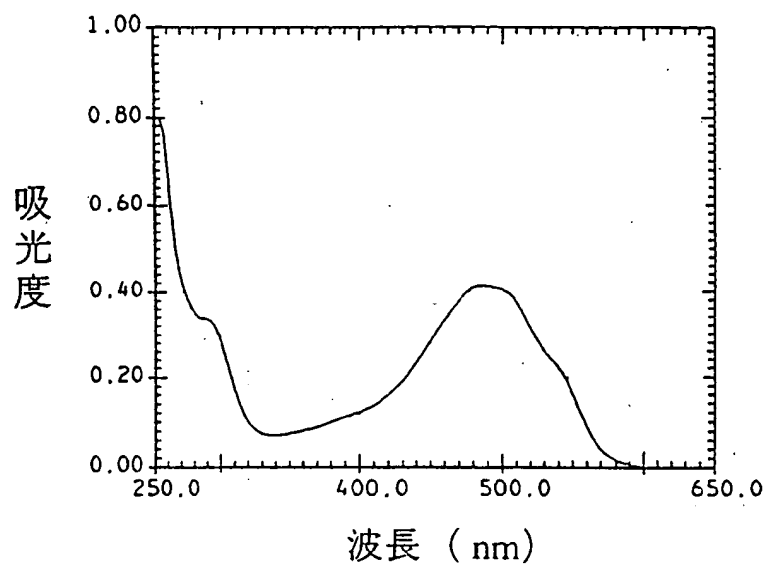


FIG. 7

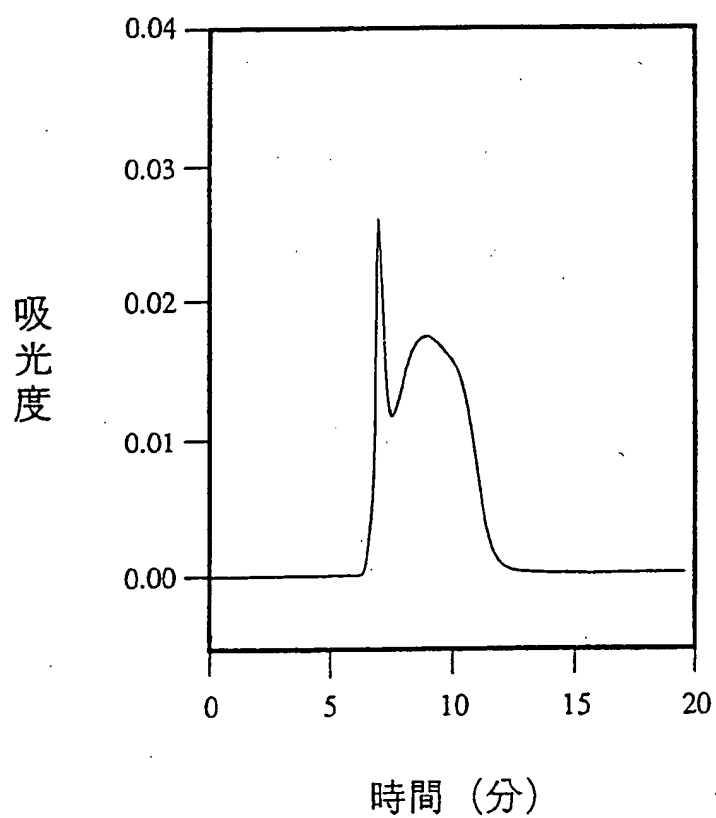


FIG. 8

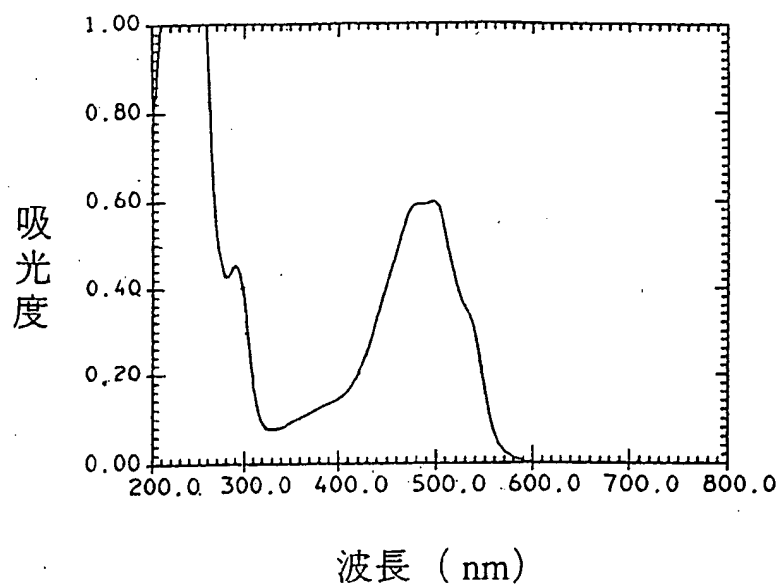


FIG. 9

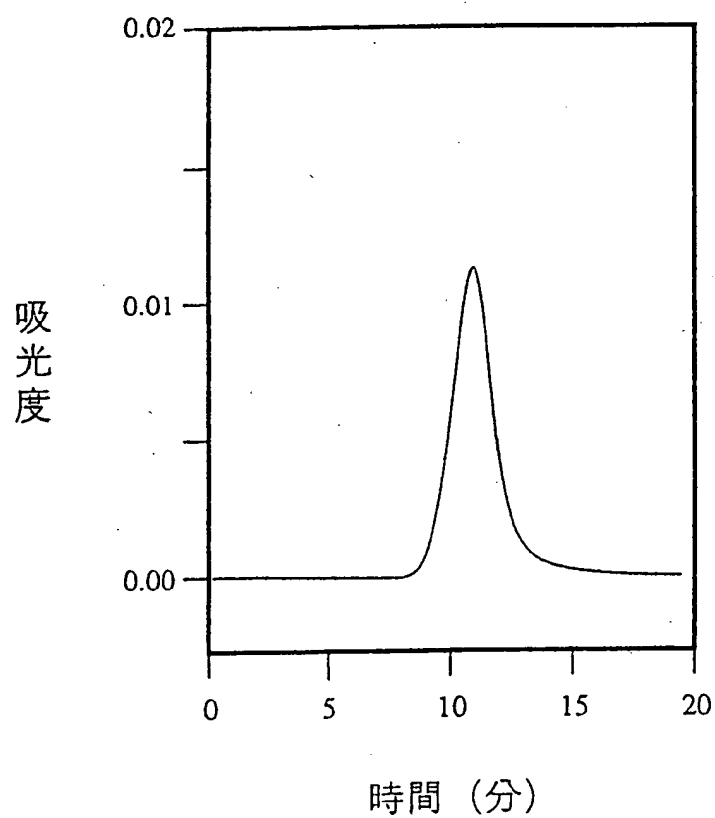


FIG. 10

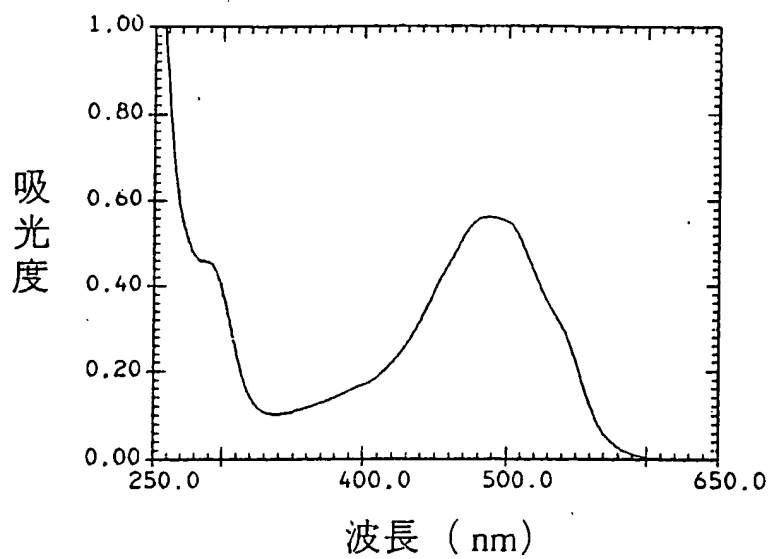


FIG. 11

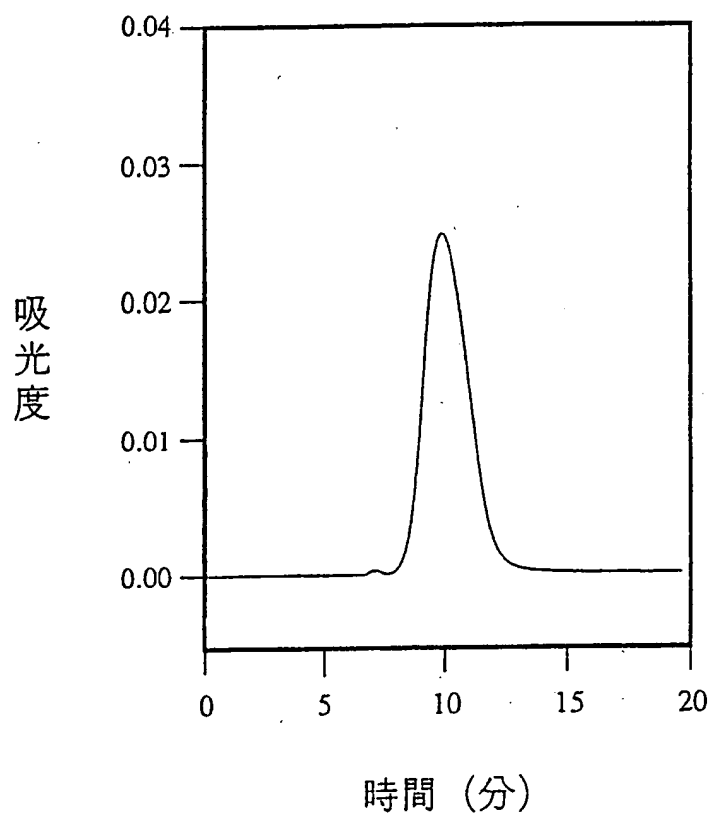


FIG. 12

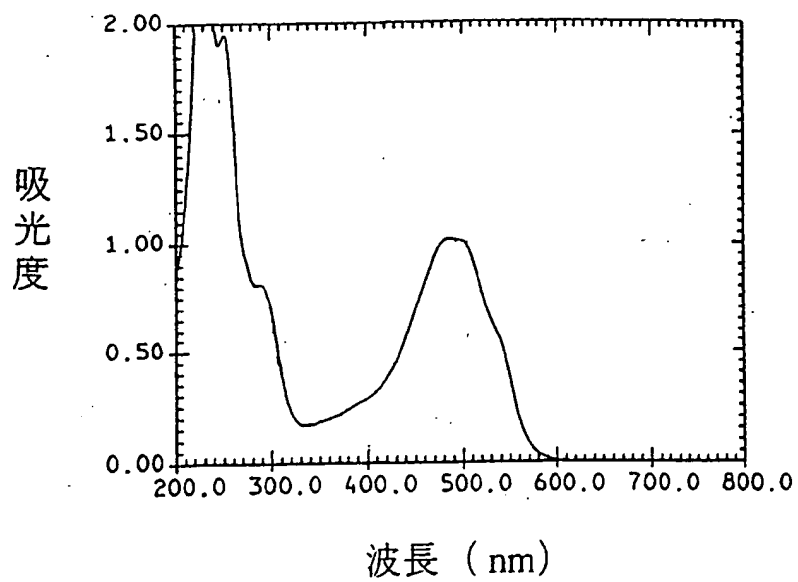


FIG. 13

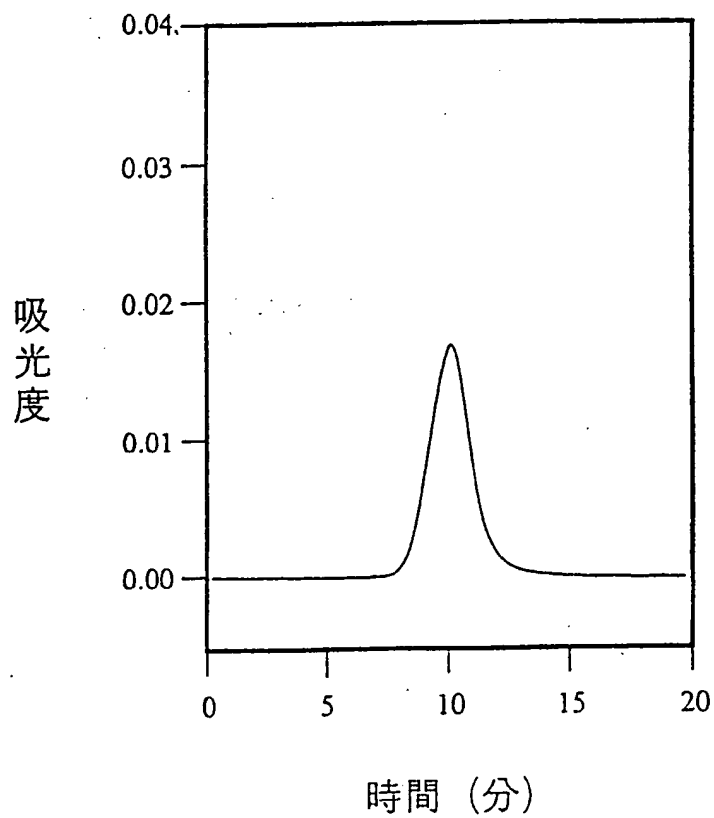


FIG. 14

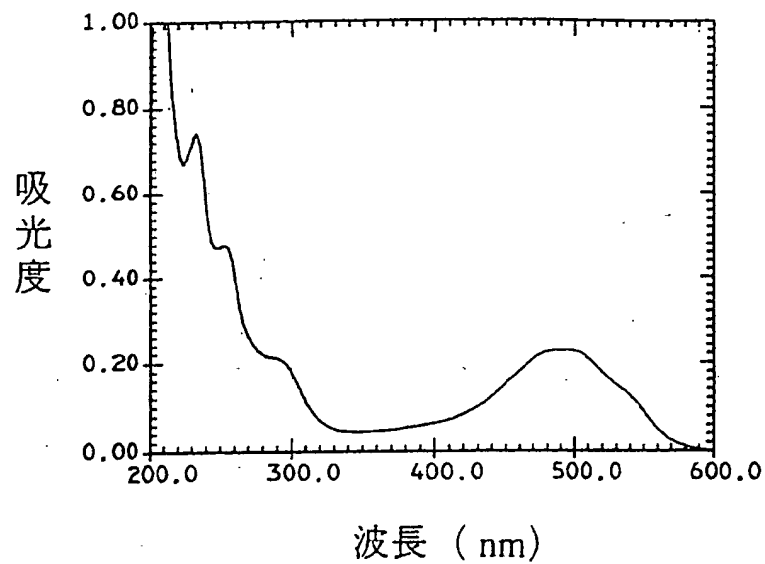


FIG. 15

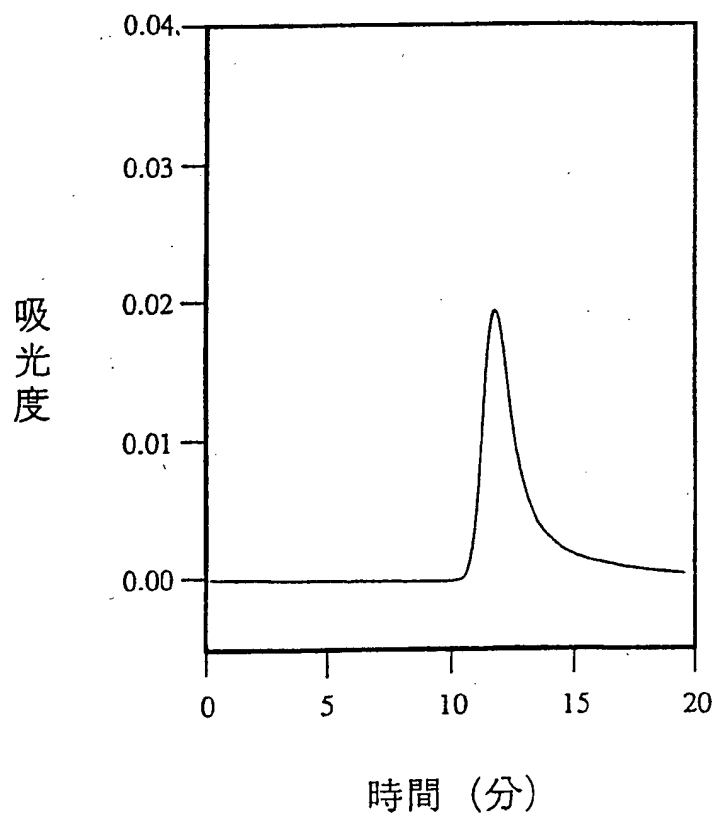


FIG. 16

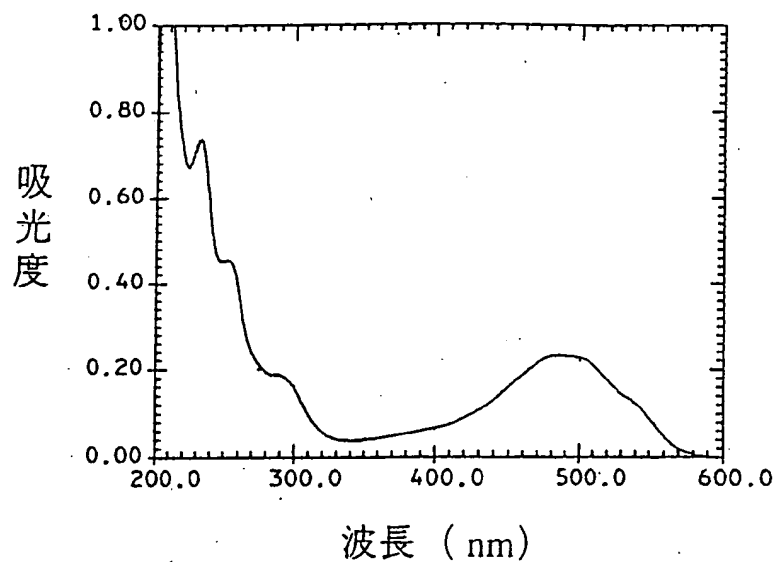


FIG. 17

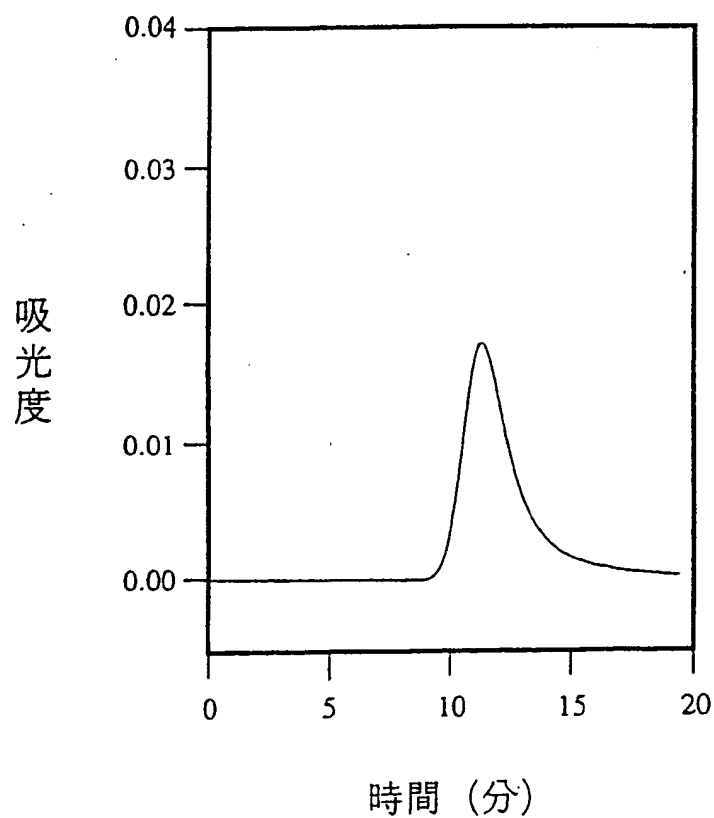


FIG. 18

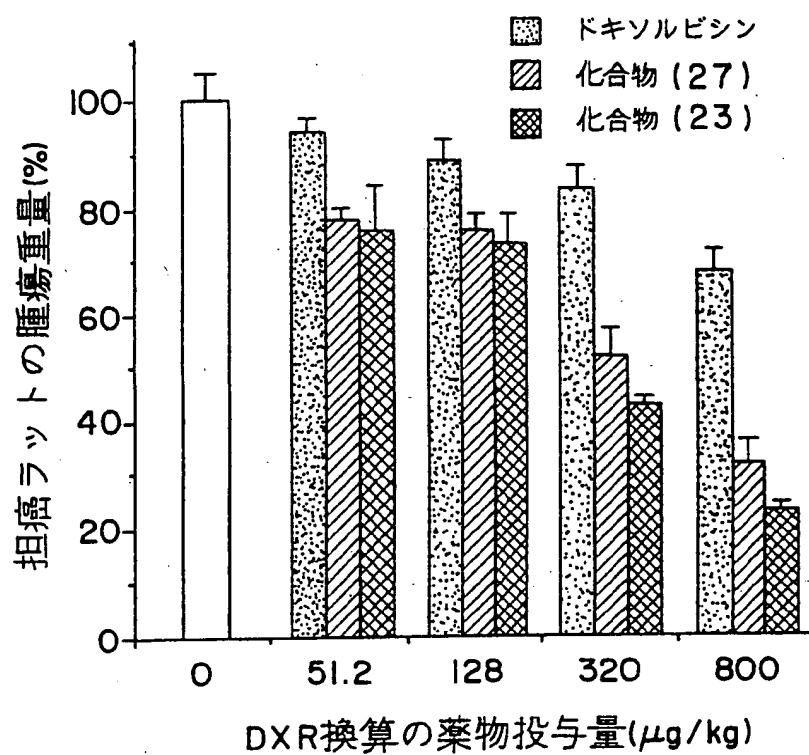


FIG. 19

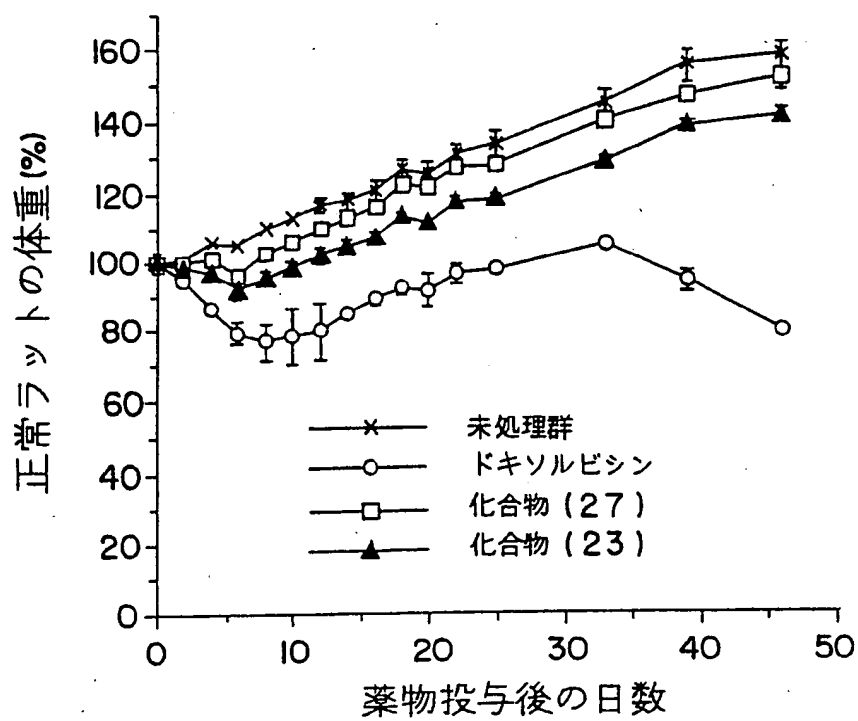


FIG. 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP, A, 59-220197 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), December 11, 1984 (11. 12. 84), Line 5, lower left column to line 4, lower right column, page 1, (Family: none) | 1-16 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 9, 1994 (09. 05. 94)

Date of mailing of the international search report

May 17, 1994 (17. 05. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08B37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | JP, A, 59-220197 (雪印乳業株式会社), 11.12月.1984 (11.12.84), 第1頁左下欄.第5行-右下欄第4行 (ファミリーなし) | 1-16 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.05.94

国際調査報告の発送日

17.05.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙 二

電話番号 03-3581-1101 内線

4 C 7 4 3 3

3 4 5 2